

生命科学实验指南系列



Short Protocols in Immunology

精编免疫学实验指南

〔美〕J. E. 科利根　B. E. 比勒　D. H. 马古利斯　E. M. 舍瓦奇　W. 斯特罗贝尔　编著

曹雪涛 等　译

科学出版社

生命科学实验指南系列·典藏版

精编免疫学实验指南

Short Protocols in Immunology

〔美〕 J. E. 科利根 B. E. 比勒 D. H. 马古利斯 编著
E. M. 舍瓦奇 W. 斯特罗贝尔

曹雪涛 等 译

科学出版社

北京

图字：01-2006-7061 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016
ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ.①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2016 年 7 月第一次印刷 印张：1310 1/2
字数：31 074 000

定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

《精编免疫学实验指南》参译人员

主　译　曹雪涛

副主译　于益芝　孙卫民

参译人员（按姓氏汉语拼音排序）

陈国友　郭振红　韩德平　蒋应明　李　楠

刘　斌　刘秋燕　刘书逊　孙卫民　田野苹

万　涛　王全兴　王晓健　吴艳峰　徐红梅

于益芝　张　意

译 者 序

免疫学是生命科学与医学领域的前沿学科，特别是从20世纪50年代以来，免疫学基础理论和应用技术的快速发展推动了生物学、医学、药学乃至整个生命科学的发展，使得免疫学成为当今生命科学中的一门带动性、支持性学科，其探索的重大科学问题与机体健康的维持和疾病的防治密切相关。众所周知，免疫学技术的每一次进步均极大地推动了免疫学理论研究的重大突破和框架体系的发展，也为生物高技术产业化的发展做出了巨大贡献，因此，免疫学技术的发明与应用是极为重要的，特别是当前生命科学发展日益迅猛，多个前沿领域的研究需要多学科的渗透与合作，将免疫学技术与其他相关学科的技术进行交叉融合显得尤为重要。

Wiley实验室手册（*Current Protocols*，John Wiley & Sons，Inc. 出版）是全球权威的生命科学实验技术指南，其方案经不同实验室广泛验证，并紧跟科研和技术发展的最前沿，定期更新。由著名免疫学家John E. Coligan等主编的《现代免疫学方法》（*Current Protocols in Immunology*，CPI）即是其中之一，自1991年出版至今，平均每年更新一次，成为免疫学领域广为使用并得到好评的标志性的综合实验技术手册。本书《精编免疫学实验指南》（*Short Protocols in Immunology*）是CPI的精华版，内容涵盖了免疫学常用实验技术体系的理论背景、基本原理、标准方案和最新发展，其实验操作简明规范、步骤清晰、要点突出、可行性强。该指南不仅是免疫学研究人员特别是研究生的科研工具，而且对于生命科学其他领域的研究者也有很高的参考价值。因此，科学出版社的编辑邀请我们翻译此书时，我们欣然接受。

第二军医大学免疫学研究所暨医学免疫学国家重点实验室的中青年研究人员承担了本书的翻译工作。他们多年来在相关领域从事一线研究工作，积累了丰富的理论和实践经验。在繁忙的教学和科研工作之余，他们花费了大量的时间和精力投入此书的翻译，通力合作，终成此稿。对他们在翻译此书过程中所表现出的科学精神、创业激情、团队力量，深表欣慰。感谢科学出版社的编辑引进并将本书推荐给我们组织翻译，感谢他们在编辑和文稿校对等方面所做的大量工作。最后，对在本书翻译和出版过程中提供帮助的所有同行同事们表达诚挚的谢意。

本书的翻译对译者的学术水平和翻译水平提出很高的要求，这对于参与此书翻译的每一个成员都是一项挑战。中译本在内容上忠于原著，力求科学、准确、流畅。囿于时间和知识水平等的限制，虽反复斟酌但难以尽善尽美，疏漏之处在所难免，敬请各位专家和广大读者批评和指正。

希望《精编免疫学实验指南》中译本的出版，能对国内免疫学研究及相关学科领域的进一步发展起到推动作用。

曹雪涛

2008年6月12日于第二军医大学

前　　言

本实验指南是《现代免疫学方法》(*Current Protocols in Immunology*, CPI) 的精华版。本指南详细完整地介绍了 CPI 中的主要技术和方法。本书的对象是免疫学研究人员和已学过免疫学理论的本科生和研究生，本书对其他相关科研工作者也有很好的参考价值。

尽管掌握了本书的技术有利于读者用免疫学方法设计和完成实验，但本书并不能代替免疫学的高级培训计划，也不能代替免疫学教科书。此外，为了更好地了解免疫学的术语和概念，读者应当在管理规范化的免疫学实验室中学习，以获得基本技术和安全方面的培训。

本实验指南的框架

本指南以章计。各章中有单元，每个单元介绍一种方法并包括一个以上完整的操作方案（附有材料、操作步骤和参考文献）。本指南的框架与 CPI 相同，虽然各章中的单元排列与 CPI 略有不同，但单元的题目是相同的。

本指南中许多试剂和方法是共用的。为了避免操作方案过度复杂和重复，本指南采用各单元和方案间的相互引用。附录 2 和附录 3 介绍了一些处理动物和细胞的常用技术。如果读者需要了解更多的相关技术，可参考 CPI 或其他方法学书籍，例如 *Current Protocols in Molecular Biology*、*Current Protocols in Cell Biology* 和 *Current Protocols in Protein Science* 等。

实验方案

本指南的各单元中常有多组方案，每个方案又有一系列步骤。各单元中首先列出基本方案，基本方案是总体介绍或应用最广泛的技术。备选方案用不同的设备或试剂达到同样的实验结果，由于所选材料不同，方法也与基本方案有所差异。辅助方案介绍的是执行基本方案或备选方案所需要的其他步骤，这些步骤分开描述是因为它们可能被本指南的其他部分引用，或它们的操作过程独立于基本方案和备选方案。

试剂和溶液

每一个方案所需试剂和溶液都列在步骤的前面，包括共用的储存溶液、常用的缓冲液和培养基以及各方案需要的特殊溶液。附录 1 列出所有溶液的配方。需要特别注意的是，在不同单元中，一些溶液的名称相同（如溶解缓冲液），但配方不同。因此，必须用相应的配方制备所需的试剂。为避免混淆，在附录 1 中，每一个试剂的名称后面都有附加说明列出使用该配方的单元。但常用溶液和缓冲液（如 TE 缓冲液）没有附加说明。

注：在本指南的所有方案和附录中，均必须用去离子双蒸水配制各种试剂和溶液。需要无菌操作的方案会特别注明。

设备

在每个方案的材料中，均列有该方案所需的特殊设备和器材。本指南虽未列出各方案所需的全部物品，但列出了实验室不常用的、特殊规格的或需要特别准备的设备和器材。实验室所需的常用设备列于后表，这些设备广泛应用于本指南。

产品供应商

本指南介绍了化学试剂、生物试剂和设备的产品供应商。某些注明的品牌已证明是质量最好的或者是市场上仅有的商品，或者是该方案的作者指定在方案中使用的品牌。后一种情况有助于新手在实验中应用。有经验的研究者也可以用他们熟悉的品牌做同样的实验。

参考文献

本指南仅在每个单元的最后列出该单元最基本的参考文献。如果读者想了解更多本指南中各方法的背景和应用，可参考 CPI。

安全注意事项

按照本指南各方案进行实验操作时，读者应避免直接接触下列危险物质：①放射性物质；②化学毒品或致癌剂或致畸剂；③病原性或感染性生物制剂，包括健康人和患者来源的标本；④重组 DNA 构建物。本指南仅做了有限的提醒。读者必须遵循良好的实验室规范，审慎操作和预防危险。读者有责任了解操作危险物质时的危险性，严格执行厂商、地方和国家安全部门订立的安全操作规程。必须有安全许可证才能使用放射性物质，而且要遵守国家的放射安全规定。所有活体动物的实验必须遵循动物安全规范。

有些免疫学实验有感染人类疾病的潜在危险，这些实验需要在有一定生物安全级别的实验室进行。生物安全级别 1（BL-1）针对普通环境中普遍存在的微生物，需要执行标准的微生物学规范，包括使用机械的移液设备、每天消毒工作环境、穿工作服、适当的洗手以及禁止在实验室进食和吸烟等。BL-2 针对正常健康个体中有中等致病性的病原体，实验室需要更严格的洁净条件，要有一些专门设备（如生物安全柜）和对实验室废弃物的高压灭菌等。BL-3 针对能引起严重疾病的微生物，要求实验室内部完全密闭，有单向气流，有双门进入系统等。必须在生物安全柜中操作各种组织；样本离心要在密闭的、带有安全盖的离心管中进行；必须穿特殊工作服并戴手套。BL-4 针对那些即使偶然接触也能威胁生命疾病的微生物，安全措施包括：进入工作区时按程序更换特种工作服、废弃物的消毒、严格训练所有实验室工作人员、使用 II 类生物安全柜（可物理性分隔放置样本）。如使用低等级的生物安全柜则必须连接正压通风个体生命支持系统。除了需要偶然处理大量组织样本或处理能产生气溶胶的样本以外，大多数使用含有血源病原体样本的实验室只要求 BL-2 安全级别。BL-3 实验室用于研究更危险的病原体，包括 HIV。针对特定病原体的、更详细的实验室安全级别和预防措施请参考下列标准：《微生物学和生物医学实验室生物安全》（*Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. Health and Human Services Publication #88-8395. U. S. Government

Printing Office, Washington, D. C.）和《BL-2/3的研究实验室中安全操作HIV》（*Working Safely with HIV in the Research Laboratories Biosafety Level 2/3*. Occupational Safety and Health Branch, Division of Safety, National Institutes of Health, Bethesda, Md.）。

致谢

John Wiley & Sons公司的编辑人员对本指南提供了支持和帮助，包括Tom Downey、Amy Fluet、Scott Holmes、Susan Liebeman、Maria Monte、Kathleen Morgan、Allen Ranz、Joseph White和Elizabeth Harkins。感谢前CPI编辑Ada Kruisbeek博士的奉献，她的策划对本实验指南和CPI都是非常重要的。感谢CPI丛书的编辑Richard Coico，他对CPI内容的实时更新起了关键作用，使本实验指南具有新的活力。感谢我们实验室的同事以及全世界各地学院实验室和商业实验室的同仁，他们为本手册提供了方法和材料，贡献了许多有价值的免疫学经验。

实验室标准设备

高压灭菌设备

β液体闪烁计数仪（β液闪仪）和γ计数仪

Geiger计数仪

辐射防护装备

同步细胞收集器，用于收集微孔培养的^{3}H TdR标记的细胞

过滤装置，将酸性沉淀物收集到硝酸纤维素膜或其他滤膜上

X射线胶片暗盒和增感屏

暗室和显影盘，或X-Omax自动X射线显影机

灯箱，用于观察X射线胶片

凝胶电泳装置，根据需要配置不同规格的水平电泳仪和垂直电泳仪

电源，300V，200mA的电源，用于琼脂糖电泳或聚丙烯酰胺凝胶电泳

干胶仪

UV透照仪

宝利莱一次成像照相机，用于染色凝胶的拍照

塑料袋封口器

离心机和配套转子，低速冷冻离心机（<3000r/min），一些实验需要超速离心机（20 000～80 000r/min）、大容量低速离心机（如Beckman J-6M）或带有96孔板套筒的、能离心96孔板的离心机

微量离心机

生物安全柜，带组织培养罩或层流罩；空气过滤器和气流维持装置以防培养细胞和研究者之间交叉污染

超净台，细胞培养用

显微镜和倒置显微镜

CO_2培养箱，除了特别提及，保持饱和湿度，37℃，5%CO_2浓度

37℃培养箱

通风橱，操作挥发性或腐蚀性化学物质

冰箱，4℃，－20℃

超低温冰箱，－70℃

液氮和液氮罐

微波炉，用于加热融解琼脂或琼脂糖

烤箱

分析天平和制备天平

微量滴定板读板仪（酶联仪）和荧光酶联仪
pH 计
紫外分光光度计、可见光分光光度计和比色皿
真空干燥仪
真空吸引器
多头（细胞）收集器
组分收集器
冷冻干燥机
磁力搅拌器和搅拌子
便携式加热块，可控稳定加热的金属块，用于试管和微量离心管孵育
血细胞计数板
制冰机
计算机和打印机
裁纸板，大规格
移液器和移液枪头，不同规格，可调；或多道移液器
涡旋振荡器
摇床
温控水浴锅，37℃或所需温度
水纯化系统，或玻璃蒸馏水系统，制备实验用水

器　具

烧杯和烧瓶，各种规格
玻璃瓶（如 Wheaton 公司）
洗瓶
本生灯
套管
细胞刮，无菌（如 Costar 公司）
夹具
一次性手套和石棉手套
冰桶
实验工作服，包括一次性的
记号笔
微量离心管，1.5ml
载玻片和盖玻片
研钵和研杵
Parafilm 封口膜
pH 试纸
吸管，有刻度，无菌，或巴氏吸管
塑料盒，各种规格
透明胶带纸和纸质胶带纸
尖嘴钳
试管和试管架，各种规格
放射性废物桶，液体和固体分别储存
剃刀和刀片
解剖刀和刀片
环形架
橡皮圈
橡皮塞
防护眼镜

推荐的基础读物

Abbas，AK and Lichtman，AH. 2003. Cellular and Molecular Immunology，5th ed. WB Saunders，Philadelphia.

Delves，PJ and Roitt，IM.（eds.）1998. The Encyclopedia of Immunology，2nd ed. Academic Press，San Diego，Calif.

Golding，JW. 1996. Monoclonal Antibodies：Principles and Practice，3rd ed. Academic Press，San Diego，Calif.

Goldsby, RA, Kindt, TJ, Osborne, BA and Kuby, J. 2003. Immunology, 5th ed. WH Freeman, New York.

Janeway, CA, Travers, P, Walport, M, and Shlomchik, MJ. 2004. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 6th ed. Garland, New York.

Mestecky, J, Lamm, ME, Strober, W, Bienenstock, J, McGhee, JR, and Mayer, L. 2004. Mucosal Immunology, 3rd ed. Academic Press, San Diego, Calif.

Paul, WE. 2003. Fundamental Immunology, 5th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadephia.

Rich, RR, Fleisher, TA, Shearer, WT, Kotzin, BL, and Schroeder, HW Jr. (eds.) 2001. Clinical Immunology: Practice and Principles, 2nd ed. Mosby Publisher, St Louis.

Roitt, I, Brostoff, J, and Male, D. 2001. Immunology, 6th ed. Mosby Publisher, St. Louis.

John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, and Warren Strober.

[孙卫民（前言）]

目　录

第一章 免疫应答导论

本章介绍抗体的制备。与任何生化制剂一样，需要一种简单可靠的方法来检测抗体的有无、量的多少、纯度及特异性。单元 1.1 初步介绍了基于酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）检测抗体的方法。应用不同的 ELISA，研究者可以定量或定性地检测特殊抗体的活性，或用特定抗体检测抗原。

应用简单可靠的方法检测抗体活性后，研究者能够进一步制备抗体（单元 1.2～单元 1.4）。首要的问题是需要制备多克隆抗体还是单克隆抗体。多克隆抗体的优势在于可在多种不同生物种系中制备（单元 1.2），花费精力较少。另外，多克隆抗体特别适用于分析变性蛋白质以及免疫沉淀法和免疫印迹法。单克隆抗体制备技术的发明标志着现代免疫学技术的一大革新（单元 1.3）。采取明智的策略并进行足够的努力，用这种方法可制备出有精确特异性和（或）高亲和力的抗体。单克隆抗体是由 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞（浆细胞瘤细胞）融合形成的永生性杂交瘤细胞系产生，这种细胞系基本上可以无限量地产生抗体（单元 1.4）。

得到了抗血清或单克隆杂交瘤上清液，下一步是纯化和制备抗体片段以供实际应用。纯化的难题在于抗体序列的多样性，单元 1.5 和单元 1.7 分别介绍 IgG、IgM 和 IgD 的纯化方法。在需要单价结合活性［如 F（ab′）μ］时要用到抗体分子的酶解片段，或者清除那些因为缺少不同部分而导致不能产生特定的实验性人工产物（如 Fc 段，单元 1.6）的抗体时也需要抗体分子的片段。酶解抗体首先要了解目的抗体的亚类或同种型的知识（单元 1.1），需做预实验以评价制备所需抗体片段的精细条件，最后进行制备级的酶解和纯化。

研究者经常需要能产生鼠源单克隆抗体的杂交瘤细胞系，并且需要操作抗体基因，改变恒定区或抗体结合位点，但可变区维持不变。现代 PCR 技术可以克隆杂交瘤的编码抗体重链和轻链可变区的基因，连接到编码人或其他种系恒定区基因的质粒表达载体，转染骨髓瘤细胞系，并高水平表达。此过程的具体步骤见单元 1.8。

单元 1.9 介绍了用表达抗原的 DNA 增强免疫应答的途径。介绍了核酸免疫的两种方法：①注射含有 DNA 表达载体的生理盐水；②用基因枪注射 DNA。还包括了基因枪方法中使用的 DNA 包被金珠的制备和保存方法。

参考文献：Kohler and Milstein，1975；Yalow and Berson，1960

撰 稿 人：David H. Margulies

单元 1.1 酶联免疫吸附试验

这一单元介绍用 ELISA 检测特异性抗体、可溶性抗原及细胞表面抗原。本单元末尾的表格（表 1.1.1）总结了不同 ELISA 的应用方法。

基本方案　间接 ELISA 法检测特异性抗体

该检测方法使用毫克级的纯化或半纯化抗原，能筛选抗血清和杂交瘤上清液中的特异性抗体（图 1.1.1）。1mg 纯化抗原可用于 80～800 个微量滴定板的筛选。

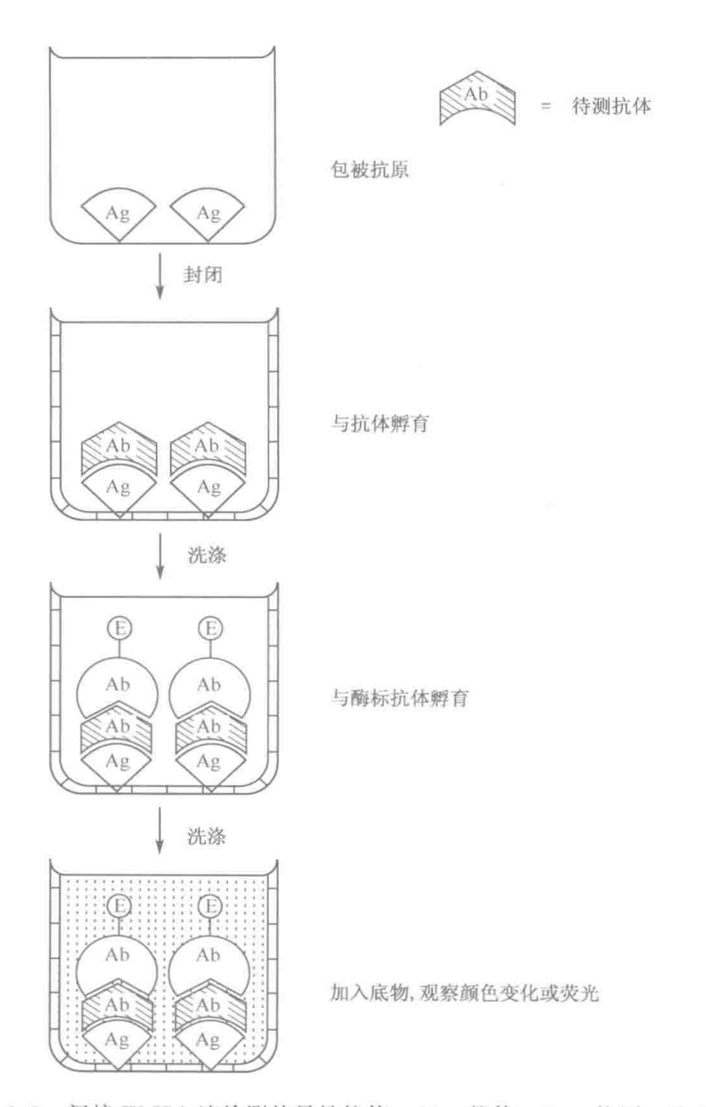


图 1.1.1　间接 ELISA 法检测特异性抗体。Ab，抗体；Ag，抗原；E，酶。

材料（带√项目见附录 1）

显色剂：碱性磷酸酶标记的蛋白 A（Sigma 公司），碱性磷酸酶标记的蛋白 G（Calbiochem 公司），碱性磷酸酶标记的抗球蛋白抗体

抗原包被液

PBSN：PBS（附录 1）中含 0.05 %（*m*/*V*）NaN_3

水：去离子或蒸馏

√封闭缓冲液

待检抗体标本溶液：用封闭缓冲液以1∶5（V/V）稀释的杂交瘤上清液（单元1.4）或腹水（单元1.4）或1∶500（V/V）稀释的抗血清（单元1.2），于锥底或圆底微量滴定板中配制（适量未免疫腹水或血清作阴性对照）

√MUP或NPP底物溶液

0.5mol/L NaOH（可选择的）

多道移液管、一次性枪头

Immulon 2或Immulon 4（Dynatech公司）滴定板或其他等同的微量滴定板

塑料冲洗瓶

微量滴定板读板仪（可选择的）：配有405nm滤光片的分光光度计、配有365nm激发滤光片或450nm发射滤光片荧光分光光度计

紫外灯，长波长（可选择的）

1. 十字交叉连续稀释分析法确定显色剂（酶标抗体）最适浓度（见辅助方案）。

   如要检测所有结合抗原的抗体，酶标抗体中抗体应含抗Igκ和λ轻链抗体。也可用适宜的酶标蛋白A或酶标蛋白G筛选单克隆抗体。能与酶标蛋白A或酶标蛋白G结合的特异单克隆抗体易于纯化和显示特性。

2. 十字交叉连续稀释分析法确定抗原包被液终浓度（见辅助方案）。用PBSN配制这种终浓度抗原溶液（纯抗原溶液通常为0.2～10.0μg/ml或≤2μg/ml）。抗原应占全部蛋白质的3%以上，全部蛋白质浓度应小于10μg/ml。每块板大约需6ml抗原溶液。

   有些抗原在不同的pH下包被更有效率。

3. 使用多道移液管和枪头，在Immulon微量滴定板每孔中加入50μl抗原溶液，并将每个孔中的抗原溶液充分振荡混匀。用塑料盖封盖滴定板，室温下过夜孵育或37℃下孵育2h。如需要，可将封盖的滴定板在4℃下保存数月。

4. 弃去包被液，在水槽上方将洗瓶里或水龙头中去离子水或蒸馏水注入包被滴定板的孔中，洗涤滴定板2遍以上。

5. 将洗瓶里的封闭缓冲液注入每个孔内，室温下孵育30min。用水洗涤滴定板3次，后于大张吸水纸上拍干去除残留液，倒扣在纸巾上。

6. 在每个包被过的孔内加入50μl用封闭缓冲液稀释的待测抗体标本溶液。实验中注意重复利用沾染同样溶液的枪头，移液过程中用吸水纸去除枪头残留液。用封闭缓冲液洗涤枪头5次，小心地将残留液弃至纸上。防止枪头中有气泡，如气泡去不掉则更换枪头。用塑料盖封盖滴定板，室温下孵育2h以上。

7. 用水洗涤滴定板3次。将封闭缓冲液注入每个孔中，振荡混匀，室温下孵育10min。用水洗涤3次去除残留液。

8. 每孔中加入50μl含显色剂的封闭缓冲液（步骤1中选定的最适浓度）。用塑料封套包裹，室温下孵育2h以上。按步骤7洗涤滴定板。如需要，在加底物前滴定板可于4℃条件下保存数月。

9. 每孔中加入75μl MUP或NPP底物溶液，室温下孵育1h。目测观察定性显色反应，或用微量滴定板读板仪定量检测（见下述）。之后观察显色反应以检测结合的低浓度抗体（颜色深度与显色时间呈正比），加入25μl 0.5mol/L NaOH终止显色。

a. 目测出现黄色即发生 NPP 的显色反应。也可用配有 405nm 滤光片的微量滴定板读板仪定量测定。

b. 暗室内用长波长紫外灯照明，目测 MUP 的显色作用。也可用 365nm 激发滤光片、450nm 发射滤光片，以荧光分光光度计定量测定。

备选方案 1　直接竞争 ELISA 法检测可溶性抗原

该检测方法是使用特异性抗体和毫克级纯化或半纯化抗原来定性或定量测定可溶性抗原的最有效的方法（图 1.1.2）。用抗体替换特异性的酶标抗体，就可转为间接方法，以种属特异性或同种型特异性酶结合物作为第三种试剂即可检测结合的特异性抗体的量。

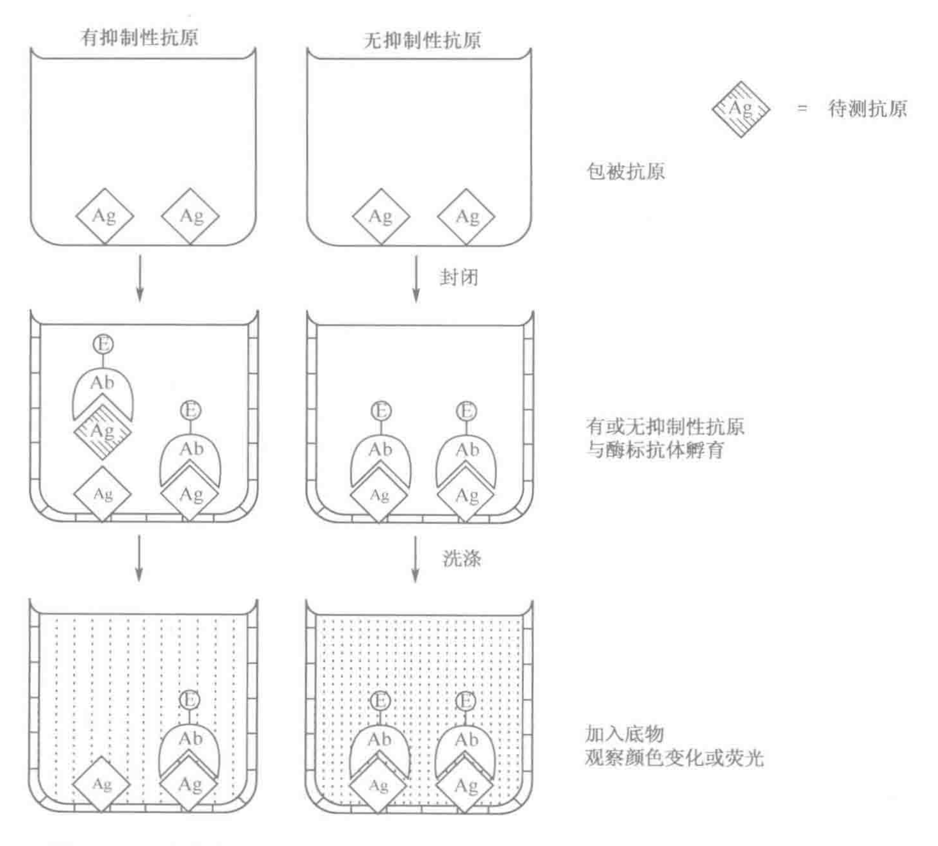


图 1.1.2　直接竞争 ELISA 法检测可溶性抗原。Ab，抗体；Ag，抗原；E，酶。

附加材料（其他材料见基本方案）

碱性磷酸酶标记的特异性抗体

标准抗原溶液

待测抗原溶液：0.2～10μg 抗原/ml，纯化或部分纯化，用 PBSN 配制，4℃下保存

圆底或锥底微量滴定板

1. 十字交叉连续稀释分析法确定包被试剂和碱性磷酸酶-抗体结合物的最适浓度，标准

抗原溶液（包被试剂）和结合物（显色剂）浓度各不相同（见辅助方案）。用封闭缓冲液稀释结合物，配制浓度为最适浓度（通常为 25～500ng 抗体/ml）2 倍（2×）的结合物溶液。每个滴定板需 3ml 结合物溶液。

2. 用 50μl 标准抗原溶液包被 Immulon 微量滴定板，并封闭（见基本方案，步骤 2～5）。
3. 为了绘制标准抑制曲线（步骤 10），用封闭缓冲液对标准抗原溶液做连续 6 次 1∶3（V/V）的稀释（见辅助方案）。应使用抑制作用动态范围大（15%～85%，通常是 1～250ng/ml）的若干稀释度，每个滴定孔每个稀释度需 75μl 以上。

   抑制作用动态范围在最初的实验里以经验确定，抗原浓度一般在 10^{-6} mol/L 和 10^{-12} mol/L 范围内变动。对于大多数蛋白质抗原，初始浓度应在 10μg/ml 左右，用封闭缓冲液以 1∶4（V/V）连续稀释 9 次，在标准检测条件下检测这些抗原稀释液抑制结合物与抗原包被滴定板结合的能力。

4. 圆底或锥底微量滴定板每孔中加入 75μl 2×结合物溶液，而后加入 75μl 抑制剂［待测抗原溶液或者是标准抗原溶液（步骤 3）］，混合孵育。将等体积的 2×结合物溶液与封闭缓冲液混合配制成未抑制的对照样本，用微量移液管上下混匀 3 次后，于室温下孵育≥30min。如需要，测定待测溶液的 2～3 个稀释度，以期在 15%～85%范围内产生抑制作用。
5. 转移 50μl 结合物与抑制剂的混合液或对照样本到一抗原包被的滴定板上（步骤 2）。对照样本放在第 11 列；单纯底物溶液（无结合物）放在第 12 列。如要测复份样品，则将其放入同一块板的相邻一列中。如需精确定量分析，每块板上应含有同源抗原溶液的不同稀释液（步骤 3），于室温下孵育 2h。
6. 洗涤滴定板（见基本方案，步骤 7），每孔中加入 75μl MUP 或 NPP 底物溶液，室温下孵育 1h。
7. 至少 1h 以后，无抑制反应中的底物充分显色，可用微量滴定板检测仪精确测量抑制作用。
8. 基于标准抗原溶液稀释液抑制作用绘制标准抗原-抑制曲线，抗原浓度对数值为 x 轴，荧光度或吸光度为 y 轴。
9. 用内插法在标准抗原抑制曲线中求出待测溶液中抗原浓度。线性偏差表明特异性抗体是异质性的，有明显不同的亲和力，或可能是配制的标准抗原溶液含异质性抗原。

备选方案 2　抗体夹心 ELISA 法检测可溶性抗原

该检测方法比抗原直接结合到固相上的 ELISA 方法敏感性高 2～5 倍（图 1.1.3）。

附加材料（其他材料见基本方案）

特异性抗体（单克隆或多克隆）或者来自抗血清、腹水或杂交瘤上清液（单元 1.4）中的免疫球蛋白（单元 1.5，单元 1.7）。

1. 用 PBSN 稀释特异性抗体或免疫球蛋白，配制包被抗体溶液（最终浓度 0.2～10μg/ml）。
2. 采用十字交叉连续稀释分析法，确定待检测抗原浓度所需的包被抗体和酶-抗体结合物的浓度（见辅助方案），用 PBSN 配制此浓度的包被抗体溶液。

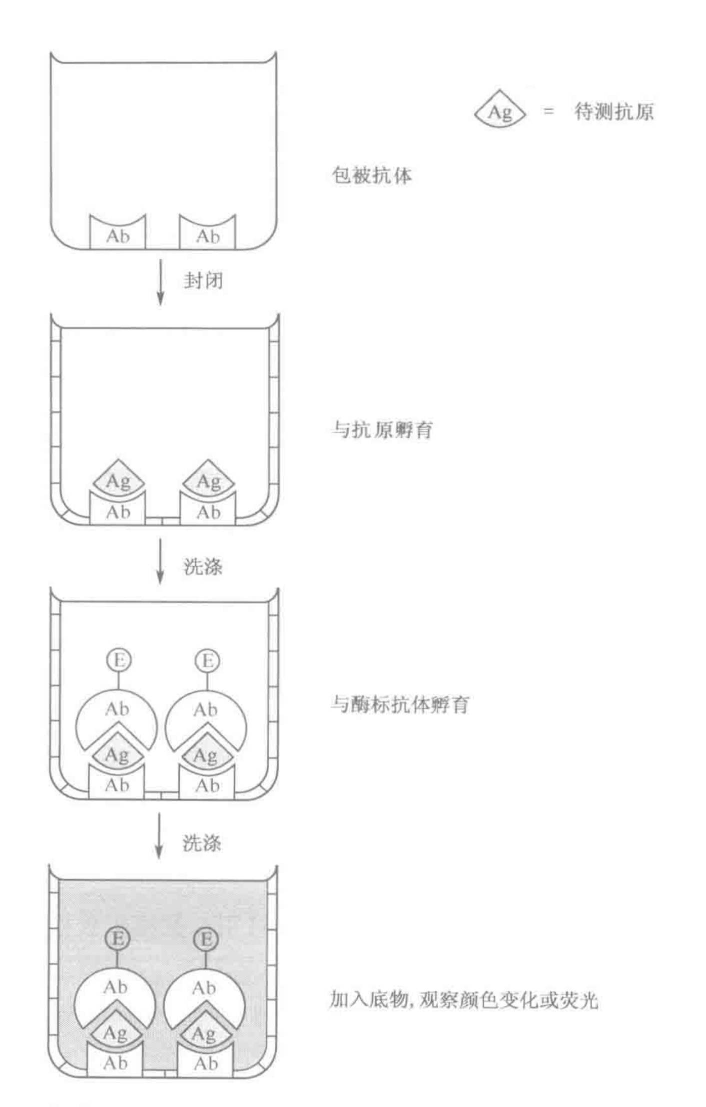


图 1.1.3　抗体夹心 ELISA 法检测可溶性抗原。Ab，抗体；Ag，抗原；E，酶。

3. 用 50μl 包被抗体溶液包被 Immulon 滴定板，并封闭（见基本方案，步骤 3～5）。
4. 用封闭缓冲液按 1∶3（V/V）连续稀释（见辅助方案）同源抗原，配制标准抗原的系列稀释溶液。使用结合动态范围大（15%～85%，总范围是 0.1～1000ng 抗原/ml）的稀释液。

   虽然标准曲线对于精确测定待测样品中抗原量是必要的，但不需要用于定性检测。

5. 用封闭缓冲液配制待测抗原溶液的系列稀释度（通常是 1～100ng 抗原/ml）。如需要，测定待测抗原溶液 1～2 个系列稀释度，确保至少一个稀释度可以精确测定。
6. 抗体包被孔中加入 50μl 待测抗原溶液或标准抗原稀释液（步骤 4），室温下孵育 2h 以上。做 2 或 3 个复孔确保可精确定性测量，快速加入样品以最大限度减少因孵育时间不同造成的误差。

7. 洗涤滴定板（见基本方案，步骤 7），加入 50μl 碱性磷酸酶标记的特异性抗体（通常是25～400ng 特异抗体/ml），室温下孵育 2h。
8. 洗涤滴定板，每孔中加入 75μl MUP 或 NPP 底物溶液，室温下孵育 1h，用微量滴定板检测仪检测。如显色反应水平低，应在显色后数小时重新检测滴定板。
9. 绘制基于标准抗原溶液连续稀释数据的标准曲线。抗原浓度对数值为 x 轴，荧光度或吸光度为 y 轴。用内插法，在标准曲线中求出待测溶液中抗原浓度。

备选方案 3　双抗体夹心 ELISA 法检测特异性抗体

在有少量酶标特异抗体但无法获得纯化抗原时，用该检测方法筛选特异性抗体最为有效（图 1.1.4）。另外，这种方法也可利用那些结合同一抗原的不同单克隆抗体来绘制抗原表位图。

附加材料（其他材料见基本方案）

包被抗体溶液（特异性针对待测种属免疫球蛋白的抗体，不结合抗原或标记抗体）
碱性磷酸酶标记的针对抗原的特异性抗体

1. 用 50μl 的 2μg/ml 或 10μg/ml 包被抗体溶液包被 Immulon 微量滴定板，并封闭板孔（见基本方案，步骤 2～5）。用较低浓度分析杂交瘤上清液或腹水，较高浓度用于分析抗血清。
2. 用封闭缓冲液按 1∶5 或 1∶200（V/V）分别稀释杂交瘤上清液、抗血清或腹水，配制待测抗体溶液。在已包被孔中加入 50μl，室温下孵育 2h 以上，洗涤（见基本方案，步骤 7）。
3. 用封闭缓冲液配制 20～200ng/ml 的抗原溶液。往抗体包被孔中加入 50μl 等量抗原溶液，室温下孵育 2h 以上，洗涤。
4. 板孔中加入 50μl 碱性磷酸酶标记的针对抗原的特异性抗体（通常是 25～500ng 特异性抗体/ml），室温下孵育 2h，洗涤。

   酶标抗体浓度应足够高，保证 NPP 为底物时在 405nm 下产生大约 0.50 吸光度单位/h 的光强度，或 MUP 为底物时产生 1000～1500 荧光吸光度单位/h。应注意在可得到试剂条件下设置阳性对照系统。这种试剂可在 *Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents* 中查知。

5. 每孔中加入 75μl MUP 或 NPP 底物溶液，室温下孵育 1h。然后，目测检查酶解作用或用分光光度计定量测定（见基本方案，步骤 9）。如要检测低水平反应，酶解作用数小时或数天后再次测定。
6. 检测出的抗原特异性抗体应重新筛选以确定是否为假阳性。每个阳性样本中，用捕获抗体包被 4 个板孔，并将待测抗体和包被抗体结合在一起（步骤 1 和 2）。用抗原孵育 2 孔（步骤 3），另 2 孔用封闭缓冲液封闭，4 孔内都加入酶标抗体和底物（步骤 4 和 5），1h 后检测显色反应。

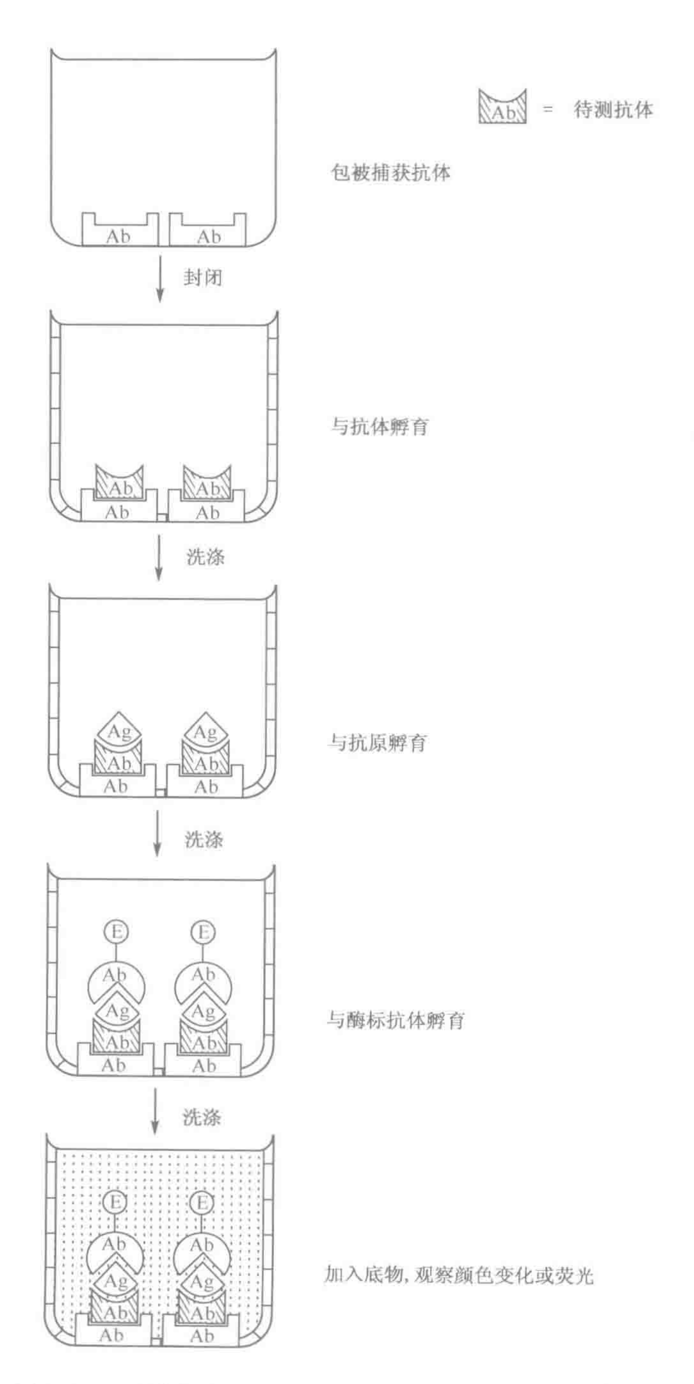


图 1.1.4 双抗体夹心 ELISA 法检测特异性抗体。Ab，抗体；Ag，抗原；E，酶。

备选方案 4 夹心 ELISA 法检测同种型

附加材料（其他材料见基本方案）

抗同种型包被抗体：重链特异抗体（抗 μ、α、γ、δ、ε）、重链亚类特异抗体（抗 γ1、γ2a、γ2b、γ3、γ4）或轻链同种型特异抗体（抗 λ 和 κ）（不可结合显色剂中的抗体）

标准同种型抗体（如已知同种型纯化抗体）

显色剂：碱性磷酸酶标记抗全部免疫球蛋白重链的特异性抗体

1. 用 PBSN 稀释最适浓度抗同种型抗体，配制成 2μg/ml。

   筛选杂交瘤上清液的 IgG（抗 γ），应最先配制识别所有同种型 IgG 亚类的包被抗体，在随后分析中用特异亚类包被抗体。

2. 用 50μl 包被抗体溶液包被 Immulon 微量滴定板的每个孔，并封闭（见基本方案，步骤 3～5）。
3. 配制大约 500ng/ml 标准同种型抗体溶液作为阳性对照。
4. 转移 50μl 的待测样品或标准同种型抗体溶液到抗体包被的孔中。每块板上设阴性对照孔（即未包被待测样本溶液或对照抗体溶液），室温下孵育 2h 以上，洗涤（见基本方案，步骤 7）。
5. 配制显色剂，最终显色剂溶液大约含 200ng 抗免疫球蛋白/ml。每孔中加入 50μl 碱性磷酸酶标记抗体（包括阳性和阴性对照组），室温下孵育 2h，洗涤。
6. 每孔中加入 75μl MUP 或 NPP 底物溶液，室温下孵育。定时检查滴定板底物显色作用（见基本方案，步骤 9；阳性对照大约 1h），反应弱的孵育数小时后或过夜再行检测。待测溶液需比阴性对照组信号高出 3 倍以上才可定性为阳性。

备选方案 5 直接细胞 ELISA 法检测细胞表面抗原

在测定单一细胞群体的抗原表达水平时，该检测过程（图 1.1.5）与流式细胞分析一样灵敏（单元 4.1、单元 4.2）。但在检测混合细胞时，敏感性不及流式细胞分析。用生物素化的抗体替代酶标抗体，就可转化为间接方法，而后加入亲和素标记的碱性磷酸酶再次孵育可增加敏感性。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

细胞样品

碱性磷酸酶标记的特异性抗体

√冰冷的洗涤缓冲液

25%（*m*/*V*）戊二醛（EM 级；Sigma），可选用

PBSLE：PBS（附录 1），加 100mmol/L 赖氨酸或 100mmol/L 乙醇胺，可选用

锥底或圆底微量滴定板

1. 使用不同数量的阳性和阴性对照细胞样品和不同浓度碱性磷酸酶标记抗体，十字交叉连续稀释分析法确定每孔添加的最适细胞数和酶标抗体最适浓度（见辅助方案）。

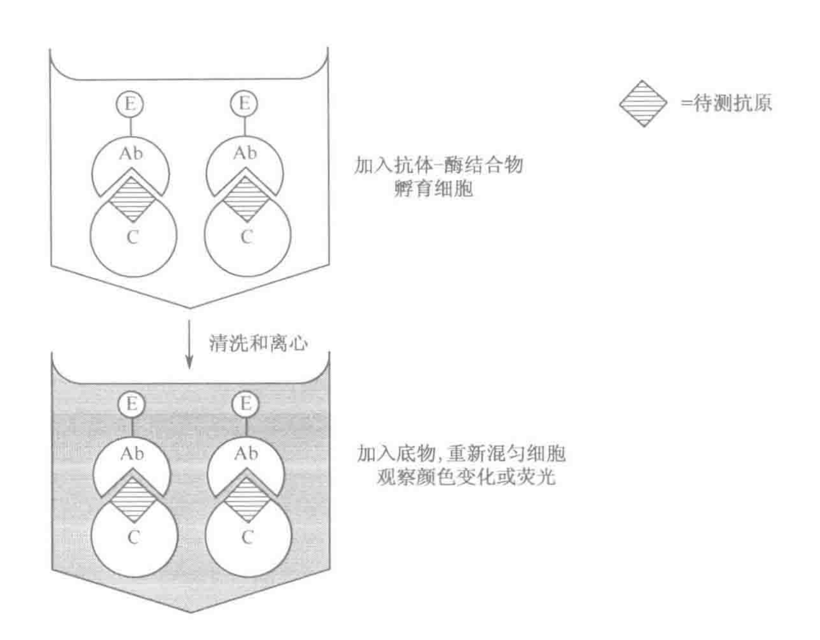


图 1.1.5 直接细胞 ELISA 法检测细胞表面抗原。Ab，抗体；C，细胞；E，酶。

开始时以每孔 $1\times10^5\sim5\times10^5$ 个细胞和 $0.5\sim10\mu g/ml$ 酶标抗体滴定。

预试验中仅加入底物孵育，检测待测细胞本身是否表达碱性磷酸酶。如果表达量较大，影响酶标抗体的敏感性，则用另一种酶标记复合物，如β-半乳糖苷酶。

2. 使用台式离心机，将细胞样品加入 15ml 或 50ml 离心管，4℃，450g 离心 5min。计数细胞量（附录 3A），并用冰冷的洗涤缓冲液重新将细胞混匀，配制成 $1\times10^6\sim5\times10^6$ 个细胞/ml（步骤 3）。
3. 可选：用 0.5%（V/V）戊二醛（终浓度）固定细胞并混匀，室温下孵育 30min。离心沉淀细胞，去上清液，用 PBSLE 重新悬浮细胞，37℃下孵育 30min。用 PBSLE 洗涤 2 次并用洗涤缓冲液重新混匀。如需要，可 4℃下储存细胞数月。

   如固定后细胞表面抗原仍保持其抗原性，可在实验开始时就固定细胞。
4. 将 100μl 细胞悬液（$1\times10^5\sim5\times10^5$ 个细胞）加入锥底或圆底微量滴定板孔中，4℃，450g 离心 1min。真空吸去上清液，将微量滴定板置于振荡器或微量滴定板摇床上，悬浮沉淀物。
5. 用 100μl 最适浓度的酶标抗体（步骤 1），在冰冷洗涤缓冲液中重新混匀沉淀物。4℃下孵育 1.5h，每隔 15min 柔和摇动微量板重新混匀细胞，注意不要使细胞悬液溅出孔板。
6. 4℃，450g 离心细胞 1min，真空吸去上清液，振摇悬浮沉淀物，加入 200μl 冰冷的洗涤缓冲液重新将其混匀，重复 3 次。
7. 加入 100μl MUP 或 NPP 底物溶液。室温下孵育 1h，显色过程中，每隔 15min 柔和摇动微量板混匀细胞。目测或使用微量滴定板检测仪（见基本方案，步骤 9）确定显色程度。

备选方案 6　间接细胞 ELISA 法检测抗细胞表面抗原的特异性抗体

本检测方法可用来筛选细胞表面抗原的特异性抗体（图 1.1.6）。

注意： 所有步骤必须在 4℃、含有 NaN_3 的生理缓冲液中进行。

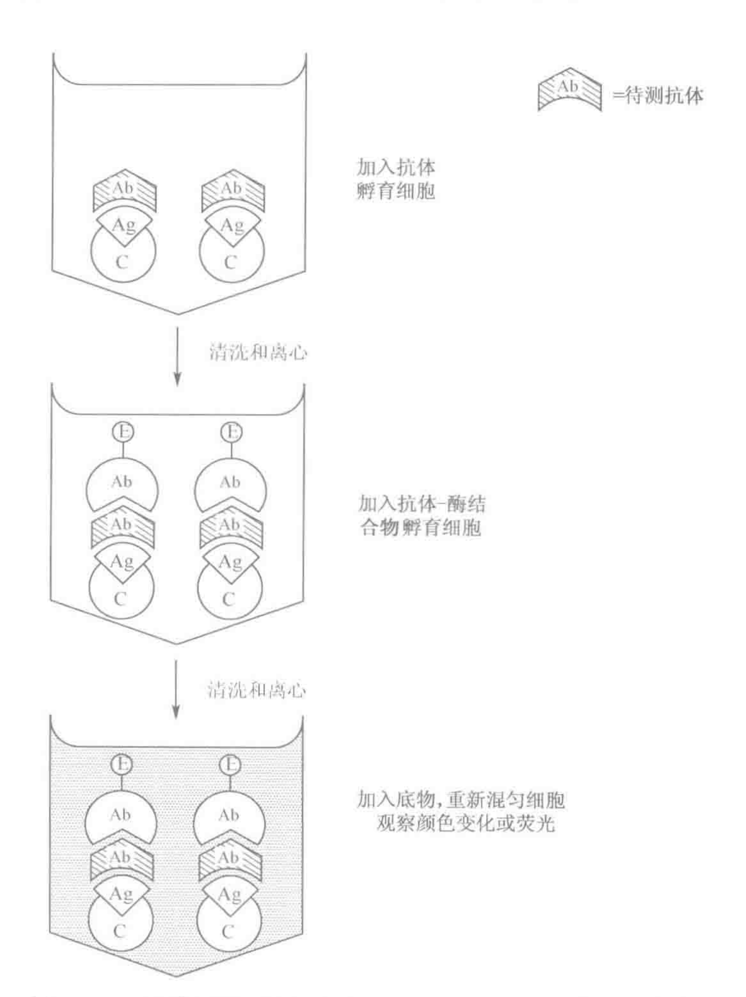


图 1.1.6　间接细胞 ELISA 法检测细胞表面抗原的特异性抗体。
Ab，抗体；C，细胞；E，酶。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

未混合的细胞样品

碱性磷酸酶标记抗体或 $F(ab')_2$（从免疫动物中获得的抗免疫球蛋白抗体）

阳性对照抗体（即与实验细胞反应的从免疫动物中获得的抗体）

阴性对照抗体（即不与实验细胞反应的抗体）

√冰冷的洗涤缓冲液

锥底或圆底微量滴定板

1. 用阳性和阴性对照抗体替换待测抗体，全细胞替换包被液，十字交叉连续稀释分析法确定每孔需添加的最适细胞数和碱性磷酸酶标记抗体或 F（ab′）$_2$ 的浓度（见辅助方案）。初始滴定时每孔加入 1×10^5～5×10^5 个细胞、0.1～10μg/ml 阳性和阴性对照抗体、0.1～10μg/ml 酶标抗体。

   预试验中仅加入底物孵育，检测待测细胞本身是否表达碱性磷酸酶。如果表达量较大，影响酶标抗体的检测敏感性，则用另一种酶标记复合物，如β-半乳糖苷酶。
2. 使用台式离心机，将细胞样品加入 15ml 或 50ml 离心管，4℃，450g 离心 5min。计数细胞量（附录 3A），并用冰冷的洗涤缓冲液重新将细胞混匀，配制成 1×10^6～5×10^6 个细胞/ml。
3. 将 100μl 细胞悬液（1×10^5～5×10^5 个细胞）加入锥底或圆底微量滴定板孔中，4℃，450g 离心 1min。真空吸去上清液，微量滴定板置于振荡器或微量滴定板摇床上，悬浮沉淀物。
4. 用 100μl 待测抗体或对照抗体（1～10μg/ml），在冰冷的洗涤缓冲液中重新混匀沉淀物。4℃下孵育 1.5h，每隔 15min 柔和摇动微量板重新混匀细胞。注意不要使细胞悬液溅出孔板。
5. 4℃，450g 离心细胞 1min，真空吸去上清液，振荡悬浮沉淀物，加入 200μl 冰冷的洗涤缓冲液重新将其混匀，重复 2 次。
6. 取 100μl 酶标抗体或酶标 F（ab′）$_2$（细胞表达 Fc 受体时用），用冰冷的洗涤缓冲液稀释到最适抗体浓度（通常是 100～500ng/ml）重新混匀沉淀物。4℃下孵育 1.5h，每隔 15min 柔和摇动微量滴定板重新使细胞混匀。
7. 按步骤 5 洗涤细胞，重复 3 次。
8. 加入 100μl MUP 或 NPP 底物溶液，进行显色，直至信号达到预想水平；显色过程中，每隔 15min 柔和摇动微量滴定板重新使细胞混匀。如需要，加入 25μl 0.5mol/L NaOH 终止显色。目测或用分光光度计定量检测确定显色程度（见基本方案，步骤 9）。

辅助方案　十字交叉连续稀释分析法（criss-cross serial-dilution analysis）测定试剂最适浓度

从该分析法得到的结果（图 1.1.7）可用来调整在基本方案和备选方案中用到的试剂最适浓度。

附加材料（其他材料见基本方案）

包被试剂
第二反应试剂
显色试剂
17mm×100mm 和 12mm×74mm 试管

1. 置 4 支 17mm×100mm 试管于试管架，后 3 支试管中加入 6ml PBSN。试管 1 中配制浓度为 10μg/ml 包被试剂的 PBSN 12ml。从试管 1 中吸取 6ml 溶液转移至试管 2。用移液管将试管 2 中的溶液吸上吹下混匀 5 次。重复溶液转移和混匀至试管 3 和 4；此时从试管 1 到试管 4 包被试剂浓度分别为 10μg/ml、5μg/ml、2.5μg/ml 和

第二反应试剂

同源（抗原）　　　　异源（抗原）

第三反应试剂（抗体-碱性磷酸酶）

(ng/ml)	200	50	12.5	3.12	0.78	0	200	50	12.5	3.12	0.78	0	行
													A
500	over	over	over	3200	**1000**	0	500	120	40	20	**10**		B
250	over	over	over	2060	560	0	300	80	20	0	0		C
125	over	over	3650	**1370**	360	0	195	40	10	**10**	0		D
62.5	3600	4000	2270	790	240	0	120	30	10	10	10		E
31.25	2700	2100	**1200**	410	120	0	60	10	10	10	0		F
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		G
													H
列	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

图 1.1.7　抗体-夹心 ELISA 检测抗原的十字交叉连续稀释分析法结果（针对第二和第三反应试剂浓度的优选）。列 1～11 和行 B～G 的数字代表在 96 孔微量滴定板上的每个孔所能观察到的相关荧光单位。反应试剂浓度决定于由研究者设定的单项检测变化。如果显色的时间设定为 1h，相关荧光约为 1000 相关荧光单位，同源抗原的敏感性为 780pg/ml，在酶联免疫吸附试验中用浓度为 500ng/ml 的酶标抗体。如果试验需要检测到仅仅 3.12ng/ml 的同源抗原，那么复合物的浓度就应被降低到 125ng/ml。应当注意比较同源和异源的反应（孔 B5 对 B11 和 D4 对 D10），这对于该试验中特异性和信噪比都是相当有利的。

1.25μg/ml。

2. 用多道移液管吸取 50μl 包被液至 4 个 Immulon 微量滴定板孔板中（即每一板中加入一种稀释度的稀释液）。室温下孵育过夜或 37℃下孵育 2h。
3. 用封闭缓冲液洗涤板，并封闭板（见基本方案，步骤 4～5）。
4. 置 5 支 12mm×75mm 试管于试管架，后 4 支试管中加入 3ml 封闭缓冲液。试管 1 中，准备浓度为 200ng/ml 第二反应试剂的 PBSN 4ml（对于极不敏感的检测可改用浓度为 1000ng/ml）。从试管 1 中吸取 1ml 溶液转移至试管 2。用移液管将溶液吸上吹下重复 5 次。重复溶液转移和混匀至试管 3～5；此时试管内第二反应试剂的浓度分别为 200ng/ml、50ng/ml、12.5ng/ml、3.12ng/ml 和 0.78ng/ml。如需要，配制并平行比较具有与包被试剂无反应性、异源形式的第二反应试剂的连续稀释液。
5. 吸取第二反应试剂溶液 50μl 加入前 5 列微量滴定板孔板中，第 5 列浓度为 0.78ng/ml，第 1 列为 200ng/ml。4 块包被板同样加样。室温下孵育 2h。
6. 洗涤（见基本方案，步骤 7）。
7. 置 5 支 17mm×100mm 试管于试管架上，后 4 支试管中加入 3ml 封闭缓冲液。试管 1 中，用封闭缓冲液配制 500ng/ml 显色剂 6ml。吸取试管 1 中溶液 3ml 转移至试管 2，混匀。重复溶液转移和混匀至试管 3 和 4。此时试管中显色剂浓度分别为 500ng/ml、250ng/ml、125ng/ml、62.5ng/ml 和 31.25ng/ml。
8. 吸取 50μl 显色剂至 2～6 行的每一微量滴定板的孔中，把最大稀释程度的溶液加入第 6 行孔中。4 块包被板同样加样。室温下孵育 2h 后洗涤。
9. 加入 75μl MUP 或 NPP 底物溶液至每孔中，室温下孵育 1h，目测显色程度或用微量

滴定板检测仪定量测定（见基本方案，步骤 9）。测定结果：NPP 作底物时，在 405nm 处应为 0.50 吸光单位/h；MUP 作底物时应为 1000～1500 荧光单位/h。

表 1.1.1　酶联免疫吸附试验总结

ELISA	用途	需要的反应试剂	评价
间接	抗体筛选 表位定位	纯化或半纯化的抗原；含有抗体的测试液；连接有免疫动物免疫球蛋白的酶复合物	不需要使用预存的特异性抗体；需要相对大量的抗原
直接竞争	抗原筛选；检测可溶性抗原	纯化或半纯化的抗原；含有抗原的测试液；针对抗原特异性的酶-抗体复合物	只需 2 步的快速检测；极好地测定抗原的交叉反应性
抗体夹心法	抗原筛选；检测可溶性抗原	捕获抗体（纯化或半纯化的特异性抗体）；含有抗原的测试液；针对抗原特异性的酶-抗体复合物	最灵敏的抗原检测；需要相对大量的纯化或半纯化的特异性抗体（捕获抗体）
双抗体夹心法	抗体筛选 表位定位	捕获抗体：已免疫的种属特异性的免疫球蛋白；含有抗原的测试液；针对抗原特异性的酶-抗体复合物	不需要纯化的抗原；检测过程相对长，需 5 个步骤
直接细胞	筛选细胞的抗原表达；检测细胞抗原表达	表达感兴趣的抗原的细胞；针对细胞抗原特异性的酶-抗体复合物	大量筛选的灵敏检测；对检测混合细胞表达的异质性不灵敏
间接细胞	筛选针对细胞抗原的抗体	用于免疫的细胞；含有抗体的测试液；连接了已免疫的种属的免疫球蛋白的酶复合物	当细胞表面抗原表达处于低密度时可能无法检测出特异性抗体

参考文献：Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents

撰 稿 人：Peter Hornbeck

单元 1.2　多克隆抗血清的制备

策略计划

优质抗血清的制备取决于抗原的质量、纯度和量以及检测方法的特异性和敏感性。如可能，蛋白质抗原的生化性质最好是同源的，根据预期，使用天然或变性结构。免疫家兔较为常用，因为家兔遗传学上与目前研究最多的人源和鼠源蛋白有较大差异。家兔每采一次血可提供近 25ml 血清，而不出现严重的副反应。对于小规模的或精确确定抗体特异性的实验，近交系小鼠是较好的选择；免疫接种小鼠的抗原溶液量很少，但通过一次采血而获得的血清量不超过 0.5ml。若需要大量的血清或物种种系较远时，使用大鼠和仓鼠较合适。通过反复采血，可从这些动物上获得大约 5ml 血清。单元 1.3 将进一步详细叙述制备单克隆抗体所选用动物的问题。动物活体内佐剂的选择已成为近年研究的一大难题。当给予弗氏完全佐剂时，实验动物会出现痛苦和不适的症状，需要尽职的研究人员探索其他有效的方法（如 TiterMax 和 Ribi 佐剂系统）。

注意：弗氏完全佐剂（complete Freunds adjuvant，CFA）是一种强效炎症介质，对于皮下组织与眼组织作用强烈，可能造成深层蜕皮或失明。误注射可以造成皮肤结核菌素试验阳性以及肉芽肿样反应。在处理弗氏完全佐剂时必须使用手套和保护眼镜。

注：所有使用动物的实验方案必须先经由动物保护与使用协会（IACUC）审查与批准并应完全符合实验动物保护与使用的相应法律法规。

基本方案　使用弗氏佐剂制备多克隆抗体的免疫接种法

材料（带√项目见附录 1）

家兔、大鼠、小鼠或合适品系的仓鼠

弗氏完全佐剂（CFA；Sigma）

含 1～2mg/ml 纯化蛋白抗原的 PBS 溶液：吸取其中 10～20μg，在考马斯亮蓝染色的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分析未见有污染的条带

√PBS

弗氏不完全佐剂（incomplete Freunds adjuvant，IFA；Sigma）

50ml 一次性聚丙烯离心管

带有 19G、21G 和 22G 针头的 3ml 玻璃注射器

双头同步注射针座连接器或塑料 3 通道旋塞

100ml 烧杯

1. 取一只家兔、大鼠、小鼠或适用于免疫的仓鼠，采血并用 50ml 离心管收集血样（见附录 2F）。从血样中制备血清，检测后储存（见辅助方案）。
2. 振荡 CFA 使不溶的结核分枝杆菌分散。4℃下加 2ml CFA 至 2ml 的含 0.25～0.5mg/ml 纯化蛋白抗原的 PBS 溶液（足够免疫 4 只家兔或 80 只小鼠）。注意不要使用 Tris 碱缓冲液制备乳化液。
3. 将 CFA 和抗原混合物吸入带有 19G 针头的 3ml 玻璃注射器（不用塑料注射器）。取下针头，尽可能排出空气，把注射器接到一个双头同步注射针座连接器或一个塑料 3 通道旋塞上（图 1.2.1）。将一个空的 3ml 玻璃注射器接到另一头并且推压使混合物在两个注射器之间反复来回流动。将其置于冰块上降温，使混合物的温度尽可能时刻保持在 4℃左右。当混合物变为单相且转为白色时，取下连接器或旋塞，接上一个

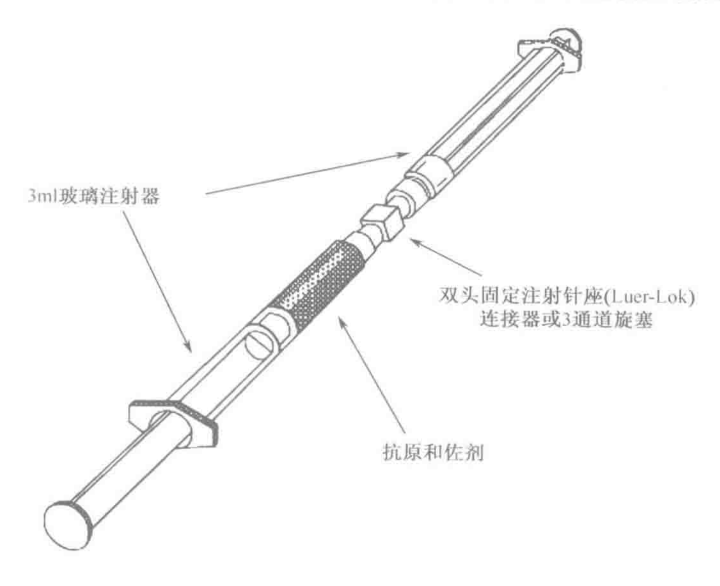


图 1.2.1　制备抗原-佐剂乳状液的双头抽吸装置。

21G 的针头，从混合物中挤出一小滴使其落到 100ml 烧杯中的 50ml 的冷水表面上，由此来检测乳状液是否稳定。如果乳状液在水面上聚成一滴，则按步骤 4 继续进行。如液滴分散，继续混合至乳状液形成。

4. 转移全部佐剂-抗原乳状液至某一注射器中，取下连接器和旋塞。在注射器上接一个 22G 的针头并赶走气泡。
5. 固定住动物（附录 2C），分别以肌内、皮内或皮下多部位注射方式给动物注射乳状液（附录 2E）。对于小鼠，应使用腹腔注射。如果该抗原效果良好，则将其在 4℃下保存数周，使用之前将其重新乳化，否则弃去未使用的免疫原。
6. 对动物免疫 10～14d 后，进行采血并收集血样，制备血清并检测。
7. 制备抗原以增强免疫（步骤 2～4）。当 CFA 作为初级免疫的佐剂时，使用 IFA 作为所有后继免疫的佐剂。在免疫之后，于 4～8 周（或在第 2 周；图 1.2.2）进行初次增强免疫，7～14d 后对动物采血并收集血样，制备血清并检测。

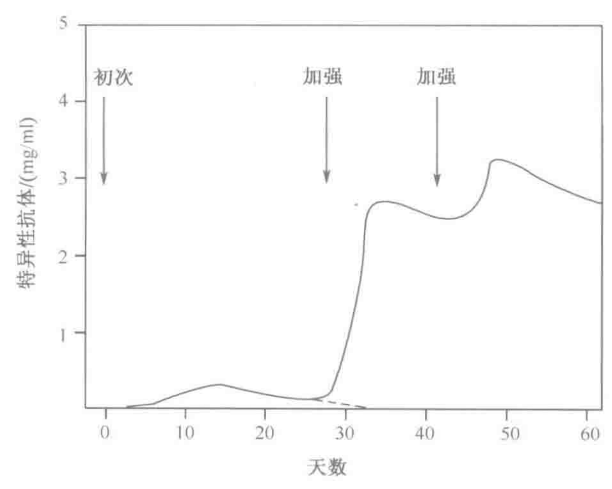


图 1.2.2　特异性抗体应答的动力学。箭头指的分别是初次免疫和增强免疫开始的时刻产生的特异性抗体的实际数量，由于蛋白的免疫原性不同将呈现出较大的差异性。

8. 每隔 2～3 周进行进一步增强免疫，注意避免会导致皮肤溃疡的反复皮内免疫。初次皮内或皮下免疫后，对家兔肌内注射以增强免疫。也可初次肌内注射免疫，增强免疫在其他部位进行。
9. 每次增强免疫 10～14d 后对动物采血并收集血样，制备血清并检测。

备选方案　使用其他佐剂制备多克隆抗体的免疫接种法

附加材料（其他材料见基本方案）

TiterMax＃R-1（CytRx；4℃下储存少于 24 个月）或 Ribi 佐剂系统（RAS；Ribi ImmunoChem；储存于 2～8℃但不冷冻）

1ml 塑料吸管

40～45℃水浴，仅用于 RAS 佐剂

1a. TiterMax：用 TiterMax 佐剂乳化房水抗原（见基本方案，步骤 1～3），但在步骤 2 中使用 0.5ml 抗原和一个 0.5ml TiterMax 管形瓶和在步骤 3 中使用 1ml 塑料注射

器（使用 TiterMax 佐剂时不要使用玻璃注射器）。此 1ml 抗原-佐剂乳化液能够免疫 20 只小鼠、10 只家兔或 1 只山羊。4℃、－20℃或－70℃下储存未用的乳状液。如需要，使用前重新乳化。

1b. Ribi 佐剂系统：40～45℃水浴加热含有 RAS 的管形瓶 5～10min。用一个 3ml 含有 21G 针头的注射器直接穿过橡皮塞向瓶中加入含有 2ml 抗原的 PBS 液。将管形瓶盖上盖子，室温条件下，剧烈振荡 3min，制备 2ml 含有 2%角鲨烯油的佐剂-抗原溶液，足够免疫 10 只小鼠、2 只家兔或 1 只山羊。4℃下储存未使用的乳状液数月。如需要较少量，向管形瓶中加入 1.0ml PBS，4℃下保存，用时，在此 PBS 液中以 1∶1（V/V）的比例混合抗原。

2. 转移乳状液至 1ml 注射器中，在注射器上接一个 22G 的针头，赶走注射器中的气泡。
3. 固定动物（附录 2C），注射佐剂-抗原乳状液。
   a. 对于 TiterMax，在家兔两侧大腿肌内注射 40μl 乳状液(每只家兔30～50μg 抗原)。
   b. 对于 RAS，给家兔多个部位注射含有 50～250μg 抗原的 RAS 1.0ml：0.05ml 皮内注射于 6 个部位，0.3ml 两侧大腿肌内注射，0.1ml 颈部皮下注射。
4. 对动物采血（附录 2F），制备抗原以增强免疫（见基本方案，步骤 6、7）。
5. 在第 4、8 和 12 周进行增强免疫。在每一次的增强免疫 10～14d 后对动物采血，制备血清（见辅助方案），检测血清，当达到较高的特异性抗原滴度时终止免疫。
   a. 对于 TiterMax，可能不是所有抗原都需要增强。如果需要进行再次免疫，第 4 周时可用可溶性抗原代替抗原-佐剂。若 10～14d 后滴度仍然很低，立即给予增强剂量的抗原-佐剂。增加抗原的量可能也有帮助。
   b. 对于 RAS，给予抗原-佐剂增强注射，其频率不要超过每 4 周 1 次。

辅助方案　从血液中制备血清

附加材料（其他材料见基本方案）

血液样品（见基本方案或备选方案）
Sorvall 离心机和 H-1000B 转子或其等同物，4℃

1. 将加有血样的 50ml 离心管于室温条件下直立 4h 使血块形成，4℃下放置过夜使血块缩小。
2. 用 1 根木签柔和地将血块从离心管的一侧拨下来（但不要碰碎血块），后用木签移出血块，如血块还没有形成，置 1 根木签于管中以引导形成血块，而后从步骤 1 重新开始。
3. 转移血清至一个 50ml 离心管中。4℃，使用 H-1000B 转子 2700g 离心 10min，保留上清液。
4. 用合适的方法检测抗体滴度：免疫沉淀（immunoprecipitation）（单元 12.2）、免疫印迹（immunoblotting）（单元 12.5）、酶联免疫吸附试验（ELISA）（单元 1.1）、琼脂中的双相免疫扩散试验（double-immunodiffusion）（CPI 单元 2.3）检测。置血清于螺口管中，－20℃下储存。部分血清在反复冰冻和解冻过程中会失去活性，其他的在 4℃下不稳定。

译者注：大多数免疫血清可加等量甘油后，于－20℃长期保存。

参考文献：Harlow and Lane，1999

撰 稿 人：Helen M. Cooper and Yvonne Paterson

单元 1.3　单克隆抗体的制备

图 1.3.1 概括了单克隆抗体（monoclonal antibody，MAb）的制备过程，并注明了

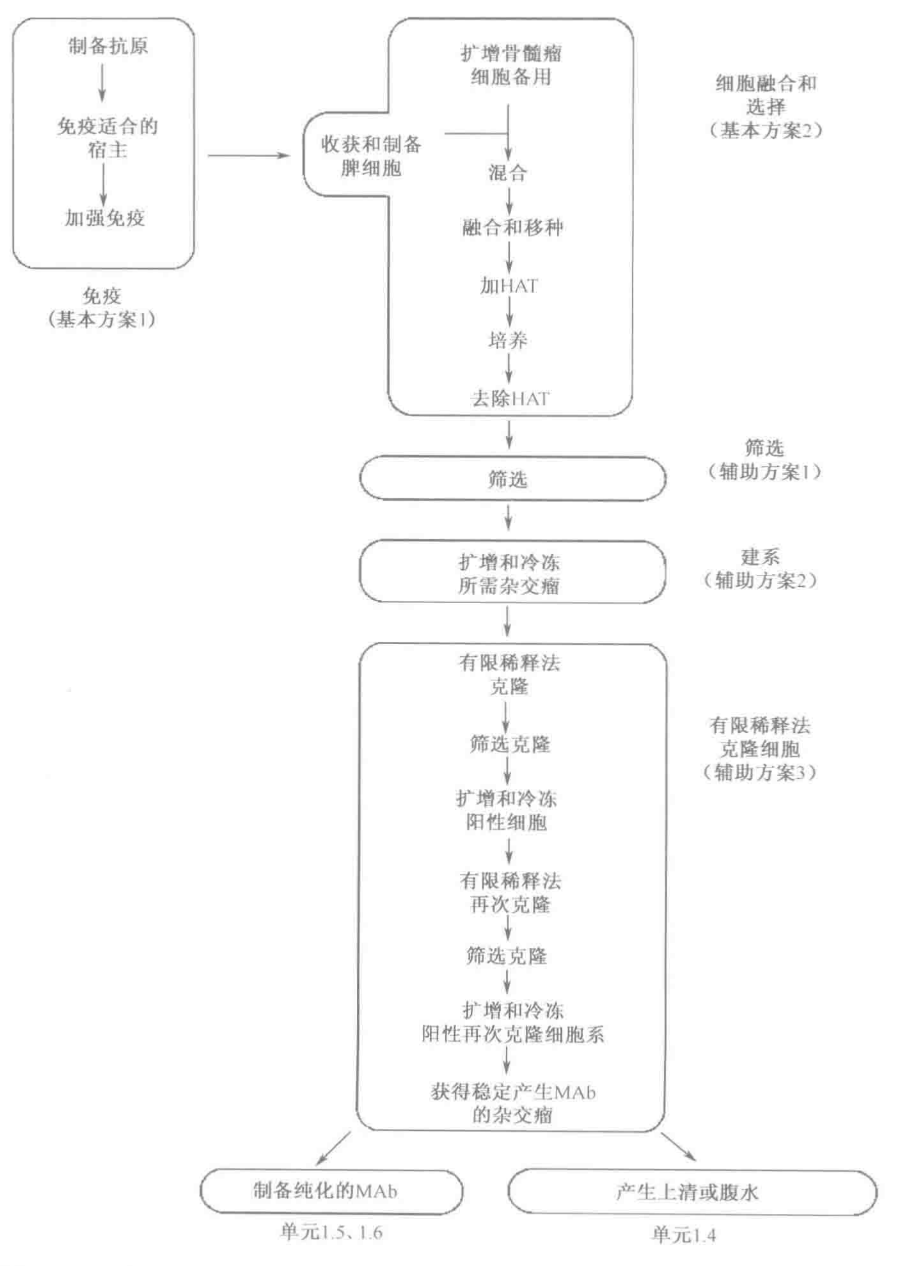


图 1.3.1　单克隆抗体（MAb）的制备过程，并注明了各步骤相应的实验方法及其所在章节。

各步骤相应的实验方法及其所在章节。提倡将单克隆抗体提交给 American Type Culture Collection（ATCC）保存。

注意：弗氏完全佐剂（CFA）是一种强效炎症介质。对于皮下组织与眼组织作用强烈，可能造成深层蜕皮或失明。误注射可以造成皮肤 TB 试验阳性以及肉芽肿样反应。在处理弗氏完全佐剂时必须使用手套和保护眼镜。

注：所有使用动物的实验方案必须先经由动物保护与使用协会（IACUC）审查与批准并应完全符合实验动物保护与使用的相应法律法规。

注：除非特别注明，所有的培养操作都应在饱和湿度、恒温 37℃、二氧化碳含量为 5%的培养箱中进行。所有与活细胞接触的试剂与仪器必须预先灭菌。

基本方案 1　单克隆抗体制备中的免疫接种

材料

靶抗原：表达于细胞的抗原，或蛋白质、多肽
生理盐水
无血清培养基：仅用于细胞接种
弗氏完全佐剂（complete Freunds adjuvant，CFA），Sigma 公司
实验动物：无病原体大鼠、小鼠（推荐使用 BALB/c 小鼠）或仓鼠（推荐使用 Cytogen研究所的美洲仓鼠）
弗氏不完全佐剂（incomplete Freunds adjuvant，IFA），Sigma 公司，可选用
1～2ml玻璃注射器（有 Luer-Lok 接头，已消毒）
三通管
100ml 烧杯
20G 注射针头，已消毒

1. 将 2×10^6～5×10^7 个细胞或 1～50μg 蛋白质或多肽置于生理盐水中制备成抗原。如果免疫原为细胞，在接种前将细胞于无血清培养基中清洗 3 次。在融合实验（见基本方案 2）前至少 3d 准备好已免疫接种的实验动物（足够用于几次的融合）。
2. 使用 1～2ml 玻璃注射器（有 Luer-Lok 接头）吸取抗原，连接三通管。
3. 完全混匀 CFA 以打散结核分枝杆菌。用另一支玻璃注射器吸取与抗原液等量的 CFA 并连接装有抗原的注射器（图 1.2.1）。
4. 将抗原液反复注入 CFA 再抽出直至稠化混合，制成乳状液。取 50ml 冷水置于 100ml 烧杯中。挤出一滴乳状液滴于冷水表面以检测乳状液是否稳定。如果乳状液呈液滴状在水面聚集，则进入步骤 5。如果液滴散开则继续混合操作直至稳定的乳状液形成。
5. 将乳状液移入一个注射器，将另一个注射器和三通管移去。将已消毒的 20G 注射针头安装于注射器上以封闭乳状液。
6. 麻醉大鼠（附录 2D），或固定小鼠或仓鼠（附录 2C）。腹腔内注射乳状液，剂量为（附录 2E）：大鼠每只 0.5～1ml、小鼠每只小于 0.2ml、仓鼠每只 0.2～0.4ml。将针头插入皮肤并于皮肤与腹膜壁间穿行一段距离后，再刺入腹膜腔。避免用力压迫注

射器的活塞以免过度的压力使针头与注射器分离，造成乳状液的喷溅。在拔出针头前转动针头以减少渗出。

7. 于 10～14d 后以大约相同剂量的抗原二次免疫动物。如果计划在免疫 3d 后进行细胞融合实验，则使用水相溶解的游离抗原或休眠期的完整细胞进行免疫。如果不立刻进行细胞融合，则应用 IFA（不含有结核分枝杆菌）乳化的抗原进行免疫，而不使用 CFA。
8. 如果需要，可以于初次和二次免疫后的 7～10d 用 ELISA（单元 1.1）或免疫沉淀法（单元 12.2）测定抗体滴度（单元 1.2）。

基本方案 2　细胞融合与杂交瘤分选

在筛选检测（辅助方案 1）方案完善之前不应进行细胞融合。由于在细胞融合后可对目标单克隆抗体进行检测的次数是有限的，在细胞融合前必须检查条件培养液以排除筛选时可能出现的人为因素影响。

材料（带√项目见附录 1）

SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系（药物标记的非分泌型；ATCC）
添加10mmol/L HEPES 和 1mmol/L 丙酮酸钠的 DMEM-10 和 DMEM-20 完全培养基（附录 1）
免疫的实验动物：小鼠、大鼠或仓鼠（在初次接种后 10～14d 备用，见基本方案 1）
√ 50%（m/V）PEG 溶液，无菌
√ DMEM 完全培养基，未添加血清
氯化铵溶液：0.02mol/L Tris · Cl，pH7.2（附录 1）/ 0.14mol/L NH_4Cl
添加10mmol/L HEPES、1mmol/L 丙酮酸钠、1×HAT 或 1×HT 的 DMEM-20 完全培养基，取自 100×包装（以 Sigma 公司产品为例），储存于 4℃一个月
70%（V/V）乙醇，仅用于容器消毒
175cm² 组织培养用细颈瓶
倒置显微镜
400ml 和 600ml 烧杯（各 3 只）
100mm 有盖培养皿
尖头镊和解剖剪
细网金属筛
50ml 塑料锥底离心管，无菌
Beckman 离心机和 TH-4 转子或同等设备
96 孔平底微量滴定板
1ml 和 10ml 移液管

1. 细胞融合前一周，开始在添加 HEPES 和丙酮酸钠的 DMEM-10 完全培养基中培养 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系（融合用细胞）。在细胞融合操作前骨髓瘤细胞对于不同的实验动物应达到以下水平（每个 175cm² 培养瓶含培养液 100ml）：小鼠，1×10^8

个细胞/瓶，2 或 3 瓶；仓鼠，2×10^{8} 个细胞/瓶，3 或 4 瓶；大鼠，$5\times10^{8}\sim1\times10^{9}$ 个细胞/瓶，10 瓶。

两个小鼠或仓鼠，或一个大鼠的脾即可满足细胞融合的需要。

2. 细胞融合前 3d，进行二次免疫（见基本方案 1，步骤 7）。
3. 细胞融合前 1d，转移 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞至新鲜的添加 HEPES 和丙酮酸钠的 DMEM-10 完全培养基中。
4. 在细胞融合前，用倒置显微镜确定 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞生长良好（折光力强，未固缩），未污染（没有明显的细菌或真菌迹象），并且生长足量。如果骨髓瘤细胞不符合这些要求则暂不进行细胞融合。
5. 将以下物品于 37℃预热：
   3 个 400ml 以及 3 个 600ml 烧杯，每个烧杯内盛 100ml 水；
   20ml 无菌的未加血清的 DMEM 完全培养液；
   5ml 无菌的 50% PEG 溶液。
6. 处死二次免疫的实验动物（附录 2G）。不要用麻醉法处死动物。对于小鼠，应用颈椎脱臼法，对于大鼠和仓鼠应用二氧化碳窒息法，取脾脏（附录 2H）。
7. 将脾脏移至预置了 10ml 无菌的未加血清的 DMEM 完全培养液的 100mm 培养皿中。以下操作要求在层流罩中超净工作台完成。
8. 使用尖头镊压碾或解剖剪将脾组织剪碎，移去组织碎片并通过细网金属筛进一步分离细胞，制成单细胞悬液。
9. 将脾细胞悬液移至已消毒的 50ml 塑料锥底离心管，并用无血清 DMEM 完全培养液加满离心管（不要使用含有蛋白质或 HEPES 的培养液）。室温下，TH-4 离心机中 500g 离心 5min，弃上清。
10. 在 5ml 氯化铵溶液中将细胞沉淀重悬以裂解红细胞。在室温下静置 5min，加入 45ml 无血清 DMEM 完全培养液，如步骤 9 进行离心。
11. 加入 50ml 无血清 DMEM 完全培养液，将沉淀重悬，并再次离心。重复添加 DMEM 和离心 1 次，以完成 2 次洗涤。
12. 在洗涤脾细胞的同时，将 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞移入 50ml 塑料锥底离心管。如步骤 9 进行离心，分离细胞。在 DMEM 中重悬细胞，如步骤 11 洗涤骨髓瘤细胞 3 次。
13. 分别在 10ml 无血清 DMEM 完全培养液中重悬脾细胞和骨髓瘤细胞。用细胞计数器和台盼蓝拒染试验对两种细胞悬液进行细胞计数和活力测定（附录 3C）。此时两种细胞悬液应该都具有 100%的细胞活力。
14. 在细胞计数的基础上，以约 2.5×10^{6} 个总细胞数/ml 计算培养细胞所需添加 HEPES 和丙酮酸钠的 DMEM-20 培养基的量。37℃水浴预热此培养基。取 96 孔平底微量滴定板做好标签备用，每 10ml 细胞悬液需准备一个孔板。
15. 将 SP2/0-Ag14 骨髓瘤细胞与脾细胞以 1∶1（V/V）的比例在 50ml 塑料锥底离心管中混合。以无血清 DMEM 完全培养液加满离心管。室温下，500g 离心 5min。
16. 在进行细胞离心的同时，在层流罩中准备三个 600ml 烧杯（步骤 5），内盛 75～100ml 37℃温水，再将 3 个内盛 100ml 37℃温水的 400ml 烧杯分别放入 600ml 烧杯

中，形成水浴环境。将预热的 50% PEG 溶液试管与无血清 DMEM 完全培养液试管（步骤 5）分别放入 2 个 37℃水浴中。

17. 吸取并丢弃混合细胞离心的上清部分（步骤 15），并将离心管置于第三个水浴烧杯中。使用 1ml 移液器向混合细胞沉淀中加入 1ml 预热的 50% PEG，在 1min 内匀速逐滴缓慢加入，每加入一滴即用移液器轻轻搅匀细胞。滴加完成后轻轻搅匀 1min。
18. 使用干净的移液管向混合细胞液中逐滴加入预热的无血清 DMEM 完全培养液，加入的同时轻轻搅匀：

    1min 内匀速滴加 1ml DMEM；

    1min 内匀速滴加 1ml DMEM；

    2～3min 内匀速滴加 7ml DMEM（使用 10ml 移液管）。

    注意，此时应有肉眼可见的细胞团漂浮。室温下，500*g* 离心 5min。
19. 在进行细胞离心的同时，将水浴烧杯重新加热到 37℃，并放入层流罩。将预热的添加 HEPES 和丙酮酸钠的 DMEM-10 完全培养基放入水浴。
20. 弃上清（步骤 18），将试管放入水浴。用干净的 10ml 移液管将预热的添加 HEPES 和丙酮酸钠的 DMEM-10 完全培养基用力吹入细胞沉淀。连续添加，直到将所有培养基加入步骤 14 准备的培养基。如果培养基体积超过了 50ml，小心地吸取多余量转入其他无菌容器，如培养瓶。如果必要，可用移液管头压碎细胞团。此后，不需继续保持细胞悬液于恒温水浴中。
21. 小心地用 10ml 移液管吸取 10ml 细胞悬液（不要使用粗糙的或重复使用的移液管）。小心地在 96 孔平底微量滴定板的每个孔中滴加 2 滴（100～125μl）细胞悬液。所有细胞悬液滴加完后，用一支干净的移液管除去过多的细胞悬液。37℃过夜培养。

    为了最大程度地减少成纤维细胞的过度生长，可加入一个可选步骤：在移种到 96 孔板之前，可以将完成融合的细胞悬液在培养瓶中培养过夜，以除去贴壁生长的成纤维细胞。
22. 培养一天后，在倒置显微镜下检查细胞生长情况。移种了合适数量细胞的孔底部将出现成片的单层高活力细胞或细胞团。
23. 用 10ml 移液管在每个孔中滴加 2 滴添加 HEPES、丙酮酸钠和 HAT 的 DMEM-20 完全培养基混合液。每块孔板需更换不同的移液管头，并保证板盖不被互换，之后将孔板置于培养箱。
24. 如果孔板发生污染，将其丢弃。或者，如果污染仅限制在 1 或 2 个孔中，按以下步骤操作：用消毒的巴氏滴管吸取受污染的孔内容物，移入空培养瓶。用 70%乙醇漂洗这些孔，并用已消毒棉签擦拭。重复洗涤 2 次。用蘸有 70%乙醇的棉签擦拭周围。当有其他孔板在层流罩中时，不要打开受污染的孔板。
25. 于培养的第 2、3、4、5、7、9、11 天，用已消毒的小号巴氏滴管吸取每个孔的一半培养液，移入空培养瓶。操作时将滴管保持 45°倾斜，贴近培养上清的表面吸取。每个孔板需使用不同的滴管。加入添加 HEPES、丙酮酸钠和 HAT 的 DMEM-20 完全培养基混合液（步骤 23），放回孵箱。如果在第 2 天和第 3 天没有发现明显的细胞死亡迹象，用加有 HAT 的培养液培养部分原骨髓瘤细胞，以检测两者的质量。

26. 培养 4d 后，根据孔中的实际细胞数量、融合效率和杂交瘤的外观及生长情况来决定是否更换培养基。避免孔中液体变成黄色（酸性）并持续 1d 以上。即使不需要更换培养液也应每天检查孔板，并在出现酸性迹象前更换培养液。
27. 培养第 14 天，改用添加 HEPES、丙酮酸钠和 HT 的 DMEM-20 完全培养液培养细胞，放回培养箱培养。
28. 培养第 15 天直至最后，改用不添加 HAT 或 HT 的含有 HEPES 和丙酮酸钠的 DMEM-20 完全培养液。当大多数孔内细胞生长到占孔底面积的 10%～25%时，可以进行杂交瘤筛选。对于生长特别稠密的孔，可以在换液后 2d，培养液变黄时进行细胞筛选（一般情况下，小鼠-小鼠细胞或大鼠-小鼠细胞融合后需 10～14d，仓鼠-小鼠细胞融合后需 14～21d；见辅助方案 1）。

　　如果在筛选检测中需用 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷摄入试验（附录 3E），至少需要更换 3 或 4 次不添加 HAT 或 HT 的含有 HEPES 和丙酮酸钠的 DMEM-20 完全培养液，稀释残留的胸腺嘧啶核苷以不影响之后的标记。

辅助方案 1　杂交瘤培养上清的筛选分析

附加材料（其他材料见基本方案 2）

在 96 孔板中生长的杂交瘤（见基本方案 2）
添加 10mmol/L HEPES 的 DMEM-20 完全培养基（附录 1）
多道移液器和 96 孔板，可选的

1. 在倒置显微镜下观察生长的杂交瘤的孔数。确定是对所有孔进行细胞筛选还是只筛选长有杂交瘤的孔。
2. 将生长的杂交瘤在 CO_2 培养箱中培养≥2d，以使抗体达到饱和滴度。
3. 用微量移液器从每个孔中取 100μl 培养上清用于检测或筛选分析，如 ELISA（单元 1.1）或间接免疫荧光法（单元 4.1）。每操作一个孔需更换新的枪头。如果是对所有孔进行细胞筛选，使用多道移液器可以方便地将培养上清移入另一个 96 孔板中。注意保持样品的顺序一致，行、列标签明确。如需对大量样本进行筛选，可以将几个孔的样品合并入一个孔。一般情况下，检测结果中只有小于 1%～5%的杂交瘤可以表达具有所需特异性的抗体（此时的抗体还不是单克隆抗体）。
4. 当完成一整块孔板的取样后，用新鲜的添加 HEPES 的 DMEM-20 完全培养基培养液填满孔板，再对下一块孔板进行操作（见基本方案 2，步骤 23）。

辅助方案 2　杂交瘤的建系

在单克隆抗体的特异性得到充分验证之前，应该对所有候选的杂交瘤进行建系。但为了减少不必要的工作量，可以选择其中 20 个最佳的候选孔。在检测这 20 个孔的培养上清（见辅助方案 1）为阳性后，应该将这些孔的细胞进行冻存，同时进行有限稀释。

附加材料（其他材料见基本方案 2）

生长的杂交瘤（见基本方案 2）

克隆和扩增用培养基（见辅助方案 4）

24 孔板

4ml 有盖试管，无菌

1. 当 96 孔板中生长的杂交瘤长到 25%～50%汇合时（主要孔），用无菌的移液器（调节为 100μl 的微量移液器）将主要孔中的细胞重悬，并将孔中全部内容物转入 24 孔板的一个孔，保证有足量的细胞在此扩增孔中扩增。若是从一个长有成纤维细胞的孔中转移细胞，应该尽早进行转移操作，以免成纤维细胞过度生长，并且操作时切忌刮到孔底（这样做会松动成纤维细胞）。
2. 用 1ml 移液器在主要孔中滴入 3 滴添加 10mmol/L HEPES 和 1mmol/L 丙酮酸钠的 DMEM-20 完全培养液（见基本方案 2，步骤 23），放回 CO_2 培养箱培养。
3. 用干净的移液器取 1～1.5ml 用于克隆和扩增的培养基加入 24 孔板，CO_2 培养箱培养 2～3d。主要孔与扩增孔要用不同的移液器从不同的试剂瓶中取用培养基。
4. 当 24 孔板中的细胞长到 25%～50%汇合时（2～3d），用有限稀释技术进行克隆操作（见辅助方案 3）。而当主要孔中的细胞长到 25%～50%汇合时，必要时可重复步骤 1～3。
5. 完成有限稀释操作之后，将 24 孔板中多余的细胞移入 4ml 无菌有盖试管中。用添加 HEPES 和丙酮酸钠的 DMEM-20 完全培养液继续培养 24 孔板中的细胞。
6. 将前述 4ml 管于室温，500g 离心 5min。将上清保留以备进一步抗体鉴定或作为对照。冻存细胞沉淀（附录 3B）。如果已确定建立了稳定的细胞克隆，那么细胞建系就完成了，将其冻存，并确保可被顺利复苏。
7. 如果有限稀释操作不能培养出有抗体分泌活性的细胞系，则复苏那些之前从 24 孔板中分离的细胞。将其重新在 24 孔板中培养，过夜，并用这些细胞重新建立有限稀释孔板。将其冻存并妥善保存。

辅助方案 3　有限稀释克隆法

附加材料（其他材料见基本方案 2）

候选杂交瘤系（见辅助方案 2）

克隆和扩增用培养基（见辅助方案 4）

微孔板观察镜（由 Flow 实验室或 Dynatech 公司提供），可选的

1. 重悬候选杂交瘤所在孔中的细胞（见辅助方案 2，步骤 4），用血细胞计数器和台盼蓝拒染试验（附录 3C）对一部分（50μl）细胞进行计数和细胞活力测试。
2. 以每毫升 50 个活细胞和每毫升 5 个活细胞的量分别准备 10ml 含有克隆和扩增用培养基的细胞悬液（根据需要多次稀释）。将细胞悬液移种至 96 孔板，每个孔 200μl（最终每孔分别为 10 个细胞和 1 个细胞）。CO_2 培养箱中培养 7～10d。
3. 观察出现杂交瘤生长的孔数，以确定哪一种稀释度对于单克隆的生长是最佳的。把孔板举高肉眼观察或使用微孔板观察镜对杂交瘤进行观察。
4. 在继续细胞培养之前，用倒置显微镜观察单克隆细胞。单一的致密细胞集落是单克隆细胞增殖的典型特征，而多克隆细胞增殖往往出现多个细胞集落，尽可能不要使

用多克隆细胞生长的孔。

5. 应用与筛选主要孔细胞（见辅助方案1）相同的方法检测培养7～14d的单克隆细胞分泌目标抗体的活性（对于小鼠-小鼠杂交瘤应于第7天；所有的孔都应该在其颜色变黄时进行检测）。使用部分原杂交瘤的培养上清（见辅助方案2，步骤6）作为阳性对照。
6. 如果已经确定得到了所需的细胞克隆，按与原杂交瘤相同的方法（见辅助方案2）扩增并冻存这个细胞克隆。
7. 按步骤1和2再次克隆阳性杂交瘤克隆，配制含有60个活细胞的40ml克隆用培养基（最终为0.3个细胞/孔），重复步骤4～6。
8. 连续3天，每天以1∶2的比例将再次克隆的细胞转入DMEM-10完全/HEPES/丙酮酸钠培养液，以使所需的杂交瘤成为稳定的细胞系。

   一株偶然克隆的杂交瘤会无法适应DMEM-10完全/ HEPES /丙酮酸钠培养液的环境，并要求较高浓度的FCS。因此，在转入DMEM-10培养基之前先将细胞转入DMEM-15培养基。在此过程中应谨防支原体污染（附录3F）。

9. 在不同天数冻存多个装有细胞的小瓶（含各不相同量的冻存用培养基，见附录3B）。复苏样品瓶，以适当方法检测细胞生长活性和培养上清中单克隆抗体（MAb）的活性。应用杂交瘤大规模制备腹水和培养上清（单元1.4）。检测MAb的同种型（单元1.1）。

   即使是再次克隆的杂交瘤也会具有不稳定性，尤其是某些仓鼠-小鼠杂交瘤。这样的杂交瘤需要继续进行克隆。长时间的体外培养可能导致MAb的不分泌。为了减少这一问题带来的影响，将部分已知可以生产MAb的细胞冻存起来是必要的，同时这些细胞将来也可以作为活性细胞的来源。

辅助方案4　克隆和扩增用培养基的制备

附加材料（其他材料见基本方案2）

小鼠(以BALB/c小鼠为例)，5或6只，4～6周龄，无病原体（有可靠来源，避免支原体感染）

$75cm^2$ 组织培养用细颈瓶

0.45μm过滤装置

1. 用颈椎脱臼法或二氧化碳窒息法处死5或6只小鼠（附录2G；避免使用麻醉剂）。无菌操作取出胸腺（附录2H）并制成单细胞悬液（见基本方案2，步骤7～9）。在20ml添加10mmol/L HEPES和1mmol/L丙酮酸钠的DMEM-20完全培养液中重悬细胞。
2. 加10ml胸腺细胞至 $75cm^2$ 组织培养瓶中。以每个胸腺20ml培养基的总量加入DMEM-20完全/HEPES/丙酮酸钠培养液（最多每个培养瓶60ml细胞悬液）。垂直放置，培养4～5d。
3. 将细胞悬液移至无菌50ml锥底离心管中。室温下，1000*g*离心5min，取上清。0.45μm过滤上清液。以10ml为一个单位，－20℃冻存。解冻后，以10%～20%的

浓度使用。

参考文献：Köhler and Milstein，1975；Oi and Herzenberg，1980

撰 稿 人：Wayne M. Yokoyama

单元 1.4 单克隆抗体培养上清与腹水的制备

美国国立研究院院报（The National Academy Press）（1999）刊登了一则由美国单克隆抗体制备方法委员会（Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies）[美国国立研究委员会实验动物研究所（Institute of Laboratory Animal Research，National Research Council）] 投交的建议书。建议书鼓励慎用动物制备单克隆抗体，并且强烈推荐尽可能的应用体外实验。

注：所有使用动物的实验方案必须先经由动物保护与使用协会（IACUC）审查与批准并应完全符合实验动物保护与使用的相应法律法规。

注：除非特别注明，所有的培养操作都应在饱和湿度、恒温 37℃、二氧化碳含量 5%的培养箱中进行。所有与活细胞接触的试剂与仪器必须预先灭菌。

注：杂交瘤应当始终处于对数生长期。应当避免长时间体外培养及体内传代。

基本方案 1 单克隆细胞培养上清的制备

材料（带√项目见附录 1）

杂交瘤（单元 1.3）

√DMEM-10 完全培养基

175cm² 组织培养用细颈瓶

50ml 塑料锥底离心管，无菌

Beckman 离心机和 TH-4 转子（或同等设备）

1. 将杂交瘤细胞移入含有 DMEM-10 完全培养基的 175cm² 培养瓶中。培养至生长旺盛和准备细胞分瓶时取用（细胞密度应达到 1×10^6～2×10^6 个细胞/ml）。避免细胞生长密度过高导致死亡。
2. 以 1∶10 的比例分出部分细胞至另一个 175cm² 培养瓶中。加入 DMEM-10 完全培养基至总体积 100ml，培养至细胞过度生长，培养基呈黄色（酸性），出现死亡细胞（大约 5d）。或者，将高密度细胞（1×10^6～2×10^6 个细胞/ ml）随新鲜培养基转入培养瓶，培养 2～3d 直到出现死亡细胞。
3. 将培养瓶内容物转入 50ml 锥底离心管。室温下，1500g 离心 10min。取上清，弃沉淀。
4. 用适当的方法检测上清液中 MAb 的滴度。
5. 无菌环境储存培养上清；通常 4℃中可以储存数周到数月，－20℃中可以储存至数年，在－70℃可以永久储存。可将培养上清等分为多个单位储存，尽量减少解冻和重新冰冻的次数。

备选方案1 单克隆细胞培养上清的大规模制备

附加材料（其他材料见基本方案1）

含有5～10mmol/L HEPES的DMEM完全培养基和DMEM-10完全培养基（附录1），pH为7.2～7.4

70%（*V/V*）乙醇

FBS

10%（*m/V*）叠氮钠，可选的

850cm² 滚筒式培养瓶和滚筒装置，37℃

250ml 塑料锥底离心管，无菌

Beckman离心机和JS-5.2转子（或同等设备）

0.45μm 过滤装置，可选的

1. 增殖杂交瘤（见基本方案1，步骤1），以1∶10的比例分离部分细胞到装有DMEM-10/ 5～10mmol/L HEPES培养基的175cm² 培养瓶中（使培养液总共100ml）。为了用蛋白A-亲和色谱法纯化MAb，需单独检测有FBS的培养基以排除污染（可能会与MAb一起被纯化出的杂蛋白）。如果需要，则在无血清培养基中培养细胞。
2. 当细胞已达到分离移种标准（一般为 1×10^6～2×10^6 个细胞/ ml）时，将培养瓶内容物转移到850cm² 滚筒式培养瓶中。加入150mlDMEM-10完全/ HEPES培养基(使培养液总量达到250ml)。塞紧瓶塞，置于滚筒装置，于恒温室或培养箱37℃恒温培养1～2d。
3. 用浸有70%乙醇的纱布擦拭培养瓶口和瓶颈。打开培养瓶，加入250ml含有HEPES培养基的DMEM-10完全培养液（使培养液总量达到500ml）。塞紧瓶塞，置于滚筒装置，37℃恒温培养1～2d。
4. 擦拭瓶口，打开培养瓶，加入2L含有HEPES的DMEM-10完全培养液（使培养液总量达到2500ml），基本装满整个培养瓶。为防止起泡，先加入培养基，后加入FBS至培养液总量的10%。塞紧瓶塞，置于滚筒装置，37℃恒温培养至培养基变黄(大约需要5d；不要过长时间滚动培养瓶，以免细胞发生破碎)。
5. 将培养液倒入250ml锥底离心管。室温下，250*g* 离心20min。取上清，弃沉淀。若不进行培养上清的生物学检测，则加入10%的叠氮钠溶液至总量的0.02%。若需对培养上清进行亲和色谱或盐析纯化，先用0.45μm过滤装置过滤培养上清。将培养上清分装后冰冻储存。

备选方案2 杂交瘤或细胞系细胞的大规模制备

附加材料（其他材料见备选方案1，带√项目见附录1）

√ PBS，4℃

1. 增殖杂交瘤（见备选方案1，步骤1～4），但与之前不同的是，当细胞生长密度适中或处于稳定生长期时停止培养。根据所需细胞数量配置多个175cm² 培养瓶（每个培

养瓶可盛 2.4L 培养基，每毫升培养基可生产数量级为 10^6 的细胞）。将每个培养瓶作为独立的单位进行培养。肉眼观察培养基颜色和混浊度，并每天对每个培养瓶进行细胞计数和成活率检测，及时停止细胞培养，以免细胞过度增殖。

2. 将细胞倒入无菌的 250ml 锥底离心管，4℃，250*g* 离心 15min，弃上清。每个离心管可连续 2 次离心细胞。
3. 将细胞沉淀置于冰面上。每 10 个沉淀合并入一个离心管，用 250ml 4℃ PBS 重悬细胞。4℃，250*g* 离心 15min，弃上清。重复上述步骤，并进一步将多个离心管的沉淀移入一个离心管。洗涤 3 次，进一步处理细胞（如细胞裂解、核素标记等）。也可以 3 次洗涤较小的细胞沉淀物后进一步处理细胞。

基本方案 2　含有单克隆抗体的腹水制备

材料（带√项目见附录 1）

裸鼠，6～8 周龄，无特殊病原（SPF），或者是同基因型宿主（注射小鼠-小鼠杂交瘤时）
姥鲛烷（Pristane，2,6,10,14-四甲基十五烷；Aldrich 公司提供）
杂交瘤（单元 1.3）
添加 10mmol/L HEPES 和 1mmol/L 丙酮酸钠的 DMEM-10 完全（附录 1）培养基
√ PBS 或 HBSS，已消毒，不含 FBS
10%（*m*/*V*）叠氮钠

18G 和 20G 或 22G 注射针头
175cm² 组织培养用细颈瓶
50ml 和 15ml 塑料锥底离心管，无菌
Beckman 离心机和 TH-4 转子（或同等设备）
10ml 注射器，无菌
56℃水浴
0.45μm 过滤装置

1. 于接种细胞前一周，用 20G 或 22G 针头给每一只小鼠腹腔内注射姥鲛烷 0.5～1ml。始终保证小鼠处于 SPF 设施中。

   远交系裸鼠虽然更加昂贵，但无需放射线处理；不一定必须使用近交系裸鼠。

2. 在盛有添加的 10mmol/L HEPES 和 1mmol/L 丙酮酸钠的 DMEM-10 完全（附录 1）培养基的 175cm² 培养瓶中增殖杂交瘤，保持细胞处于对数生长期。在接种小鼠（步骤 5）之前，用 ELISA（单元 1.1）或其他检测方法检测培养上清中 MAb 的活性，检测最好在细胞扩增之前进行。为了降低病原体进入鼠类细胞克隆的风险，应该用抗体形成实验（CPI 单元 1.1）检测细胞中的病原体。
3. 将培养物移入 50ml 锥底离心管中。室温下，500*g* 离心 5min，弃上清。用 50ml 已消毒的不含 FBS 的 PBS 或 HBSS 重悬、洗涤细胞，并再次离心，弃上清。重复 2 次后重悬细胞于 5ml PBS 或 HBSS。

4. 进行细胞计数，并用台盼蓝拒染试验（附录 3C）检测细胞活力是否接近 100%。加入不含 FBS 的 PBS 或 HBSS 调整细胞密度为 2.5×10^6 个细胞/ml。
5. 用 10ml 注射器抽取细胞。使用 22G 针头向裸鼠腹腔内注射 2ml 细胞。注射 3 只小鼠，通常至少会有一只且往往全部的小鼠都能产生含有 MAb 的腹水。腹水的产生需 1～2 周；若需要最大量的腹水应多等待 3～7d。
6. 抽取腹水：用一只手抓取并固定小鼠，绷紧腹部皮肤（附录 2C）。另一只手将一个 18G 的针头刺入腹腔 1～2cm。针头刺入时应选择左下腹或右下腹，避开上腹部的重要脏器和腹中线的大血管。在针头刺入之前应先确保针的尾部已对准 15ml 塑料锥底离心管，流出的腹水可以直接滴入离心管中。
7. 若操作中出现问题，可以参考以下解决办法。
   a. 若小鼠有大量的腹水但是无法流出，可以将针头缓慢地旋转，或换一个位置插入。
   b. 若没有腹水积蓄且小鼠的健康状况尚好，可以重新注射细胞。
   c. 若没有腹水积蓄且小鼠死亡（尤其是在注射后 2 周内发生死亡），下次注射时减少细胞的量。
   d. 若形成了实体的肿瘤，将肿瘤细胞打散、重悬，并用以注射另一只姥鲛烷预处理的小鼠。
   e. 若只形成了少量的腹水，将其注射另一只预处理的小鼠（大约 0.5ml/只）。
8. 室温下，1500g 离心腹水 10min。若液体在离心管内凝结，在离心前用细木棒在凝块与离心管壁间刮一圈，若凝块附在木棒上则将其丢弃，否则不做处理，离心后凝块将成为沉淀的部分。
9. 取上清，弃沉淀。在所有腹水收集完之前将先离心得到的腹水保存于 4℃（不超过一周）。
10. 让小鼠重新积蓄腹水（2～3d），按照步骤 6 再次提取腹水，按照步骤 8 对腹水进行处理。多次重复提取腹水，直到不再有腹水生成或小鼠死亡。将剩余的小鼠处死（附录 2G）。
11. 将之前多次抽取的腹水混合，在 56℃水浴中热灭活 45min。若有凝块形成，用步骤 8 中的方法刮离、离心去除。
12. 用适当的方法检测腹水的 MAb 滴度。以大于 1∶10 的比例稀释，并用 0.45μm 过滤装置过滤除菌。若不对腹水进行生物学检测，则加入 10%的叠氮钠溶液至总量的 0.02%。分装腹水，−70℃冻存，并避免反复冻融，可以储存数年。

参考文献：美国国家研究委员会（National Research Council），1999

撰 稿 人：Wayne M. Yokoyama

单元 1.5 免疫球蛋白 G（IgG）的纯化

基本方案 1 硫酸铵沉淀和凝胶过滤层析

硫酸铵沉淀可纯化小鼠抗体的所有亚类和其他种属抗体，本方案也可用于纯化任何

种属的 IgM、IgG 和 IgA。

材料（带√项目见附录 1）

腹水或 MAb 上清（单元 1.4）

√PBS

√饱和硫酸铵（SAS）

√硼酸盐缓冲液（可选）

聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶 S-200 Superfine（Pharmacia Biotech）

含有 0.02%（m/V）NaN_3 的 PBS（可选）

玻璃棉（Glasswool，Polysciences）

Sorvall 离心机，SS-34 型转子（或类似转子）

透析袋（无需按分子质量精确截断），保存于蒸馏水中

26mm×900mm 层析柱（Pharmacia Biotech）

1a. 适用于腹水：为了清除腹水中的脂类物质，可用足量玻璃棉盖住漏斗口，然后倒入腹水，再用 PBS 充分冲洗玻璃棉，并戴好手套，轻轻挤压玻璃棉，收集全部样品（处理玻璃棉的时候请戴手套），将滤出液于 4℃或室温下，20 000g 离心 30min，轻轻倒出上清并保存，弃去含膜和细胞碎片的沉淀。

1b. 适用于 MAb 上清：将 MAb 上清于 4℃或室温下，20 000g 离心 30min，轻轻倒出上清并保存。

2. 边搅拌边慢慢向腹水或 MAb 上清中加入 SAS 至终浓度 45%（V/V），静置 1～2h 或 4℃静置过夜，保证使所有蛋白质沉淀。

3. 4℃或室温下，20 000g 离心 1h，保留上清以检测抗体活性。用最小体积的 PBS 或硼酸盐缓冲液（10～20ml）溶解沉淀并转移到透析袋中。于 4℃在至少 20 倍体积的 PBS 或硼酸缓冲液中透析 24～48h，在透析过程中更换透析液 4～6 次，最后将蛋白质浓缩至≤5ml（CPI 附录 3H）。

4. 准备 26mm×900mm 聚丙烯酰胺葡聚糖凝胶 S-200 Superfine 层析柱，将浓缩的蛋白质溶液上样（CPI 附录 3I）。用 PBS，或含 0.02%NaN_3 的 PBS 或硼酸缓冲液洗脱蛋白质，收集 100 个组分（每个组分为 1%柱体积，约 4.5ml）。在 280nm 波长检测蛋白质组分。

5. 用非还原型和还原型 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 A_{280}>0.5 组分的蛋白质纯度（单元 12.3）。在非还原型凝胶上 IgG 的条带在 150kDa 左右，在还原型凝胶上，55kDa 左右的条带为 IgG 重链，25kDa 左右的条带为 IgG 的轻链。IgG_{2b}的重链呈非对称的糖基化，通常以二聚体形式存在。

6. 用分光光度计测定 IgG A_{280}浓度（表 1.5.1）。将含纯 IgG 的洗脱液合并，用硼酸缓冲液或含 0.02%NaN_3 的 PBS 调整 IgG 浓度至 0.1～30mg/ml，可在 4℃保存数年。长期保存可以将 IgG 置于－70℃保存，不要将抗体在－20℃储存超过一个月，要避免抗体的反复冻融。

表 1.5.1　免疫球蛋白和其片段的消光系数和分子大小

分子	A_{280}/（1mg/ml 溶液）	分子质量/kDa	
		非还原型	还原型[a]
IgG	1.43	150	50，25
IgM	1.18	900	78，25
IgM 单体	1.18	180	78，25
Fab	1.53	50	25[b]
$F(ab')_2$	1.48	100～110	25[b]
$F(ab')_2\mu$	1.38	135	44，25
$F(ab')\mu$	1.38	65	44，25

a. ，左边的数字代表免疫球蛋白重链的分子质量，右边的数字代表免疫球蛋白轻链的分子质量。

b. SDS-PAGE 上呈现二聚体。

基本方案 2　蛋白 A 交联琼脂糖凝胶亲和层析

蛋白 A 通常用于人（除 IgG_3 外；小鼠 IgG_1 结合力也较弱）、兔、豚鼠和猪抗体的纯化。

材料（带√项目见附录 1）

腹水或 MAb 上清（单元 1.4）

√PBS，pH8.0 和 pH7.3

1mol/L NaOH

蛋白 A 交联琼脂糖凝胶 CL-4B（Pharmacia Biotech 或 Sigma）

0.1mol/L 柠檬酸，pH 按照所分离的抗体亚类的需要而定（步骤 3）

10%（*m/V*）NaN_3（可选）

√硼酸盐缓冲液（可选）

3mol/L 过滤后的硫氰酸钾

玻璃棉（Polysciences）

Sorvall 离心机，SS-34 型转子（或类似转子），4℃

0.45μm 滤器，过滤 MAb 上清

透析袋

1.5cm×10cm 层析柱（如铺有玻璃棉的 10ml 注射器）

组分收集器

蠕动泵（可选）

1a. 适用于腹水：用玻璃棉去除腹水中脂类（见基本方案 1，步骤 1a），用 10 倍体积的 PBS，pH8.0 稀释腹水。

1b. 适用于 MAb 上清：于 4℃将 MAb 上清以 20 000*g* 离心后用 0.45μm 滤器过滤。对于 IgG_1 抗体，用透析（对 pH8.0 PBS）或者加入 1mol/L NaOH 的方法调整其 pH 到 8.0。对于其他抗体亚类则调整到 pH7.4。

2. 将蛋白 A 交联琼脂糖凝胶 CL-4B 装入 1.5cm×10cm 层析柱中，连上组分收集器（CPI 附录 3I）。于 4℃或室温下用 PBS，pH8.0 平衡层析柱。上样（1ml 至几升），

当上样量大时，可用蠕动泵或重力帮助上样。每毫升胶可结合约 5mg 小鼠 IgG 或 8mg 人 IgG。用流式细胞仪（单元 4.1、单元 4.2）或 ELISA（单元 1.1）检测流出的未结合组分中的抗体活性，以判断上样量是否过量。

也可选择使用 HiTrap A 蛋白预装柱（Pharmacia Biotech 或 Sigma）。

3. 用数倍柱体积的 PBS，pH8.0 洗柱，一直洗到 A_{280} 到基线水平。用适当 pH 的 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液（用 1mol/L NaOH 调整）洗脱目的蛋白：小鼠 IgG_1 用 pH6.5、IgG_{2a}用 pH4.5、IgG_{2b}和 IgG_3 用 pH3.0。

   低 pH 会损伤抗体，因此洗脱前在收集管内按每毫升洗脱液加入 50μl 2mol/L Tris-HCl缓冲液，用于立刻中和酸。

4. 合并含目的蛋白的组分，将合并组分倒入透析袋，用含或不含有 0.02% NaN_3 的 1L PBS（pH7.3）透析，期间更换二次透析液，然后置于 4℃保存。必要时可用 SDS-PAGE 进行纯度鉴定。
5. 层析柱可以先用 1 倍柱体积的过滤后的 3mol/L 硫氰酸钾清洗，然后再用数个柱体积的 PBS pH7.3 洗柱，最后保存于 4℃。

备选方案 1　蛋白 G 交联琼脂糖凝胶亲和层析

蛋白 G 和蛋白 A 在不同 pH 下结合抗体的能力不同：蛋白 G 在低 pH 下与抗体结合力强，在高 pH 下与抗体结合力弱。但一些抗体（小鼠 IgG_1 和兔、人抗体）在高 pH（8～10）下仍与蛋白 G 结合。一般推荐最好在 pH5 时结合抗体，在 pH2.8 时洗脱抗体。此法适用于小鼠 IgG_1、大鼠抗体（多数亚类结合力弱而 IgG_{2b}结合力强）、猴抗体、兔抗体、牛抗体、山羊抗体、马抗体和绵羊抗体等。

附加材料（其他材料见基本方案 2，带√项目见附录 1）

√0.1mol/L 乙酸钠，pH5.0
0.1mol/L 甘氨酸 · HCl，pH2.8
HiTrap 蛋白 G 柱（Pharmacia Biotech 或 Sigma）

1a. 适用于腹水：用玻璃棉去除腹水中脂类（见基本方案 1，步骤 1a）。
1b. 适用于 MAb 上清：于 4℃将 MAb 上清以 20 000*g* 离心后用 0.45μm 过滤器过滤。
2. 用 0.1mol/L 乙酸钠（pH5.0）将腹水上清和生物反应器上清稀释 10 倍或将 MAb 上清稀释 2 倍以上。
3. 用 0.1mol/L 乙酸钠（pH5.0）平衡 HiTrap 蛋白 G 柱并上样，每毫升树脂一般可结合约 10mg 蛋白质，但不同种属抗体结合量有所不同。
4. 用数倍柱体积的 0.1mol/L 乙酸钠（pH5.0）洗柱，再用 0.1mol/L 甘氨酸 · HCl（pH2.8）缓冲液洗脱结合的抗体。

   为了降低 pH 溶液对抗体的影响，可参见基本方案 2 中步骤 3 的注释。

5. 合并含目的蛋白的组分并透析（见基本方案 2，步骤 4）。
6. 先用 0.1mol/L 甘氨酸 · HCl（pH2.8）洗柱再生，然后用 0.1mol/L 乙酸钠（pH5.0）再平衡柱子保存。

备选方案 2　抗大鼠 κ 链单克隆抗体交联琼脂糖凝胶亲和层析

一般情况下，单克隆抗体（尤其是大鼠源性）不能用蛋白 A 或蛋白 G 交联琼脂糖凝胶层析纯化，在此情况下，可使用抗大鼠 Ig 轻链单克隆抗体交联琼脂糖凝胶层析柱来结合组织培养上清或腹水中的大鼠单克隆抗体，然后用逐步降低洗脱液 pH 的方法来确定从抗 Ig 柱上洗脱大鼠抗体的最温和洗脱条件。

附加材料（其他材料见基本方案 2）

小鼠抗大鼠 κ 链 MAb：用蛋白 A 交联琼脂糖凝胶纯化的 MAR18.5（ATCC）（见基本方案 2）

溴化氰活化的琼脂糖凝胶 CL-4B（单元 12.2；Pharmacia Biotech）

结合缓冲液：0.05mol/L Tris·HCl（附录 1）/0.15mol/L NaCl/0.02%（*m*/*V*）NaN_3，pH8.6

待纯化的大鼠抗体粗提液（MAb 上清或腹水，单元 1.4）

pH7.0 洗脱缓冲液：0.05mol/L 磷酸钠（附录 1）/ 0.15mol/L NaCl/0.02%（*m*/*V*）NaN_3，pH7.0

pH5.5 洗脱缓冲液：0.05mol/L 柠檬酸钠 / 0.15mol/L NaCl/0.02%（*m*/*V*）NaN_3，pH5.5

pH4.3 洗脱缓冲液：0.05mol/L 乙酸钠/ 0.15mol/L NaCl/0.02%（*m*/*V*）NaN_3，pH4.3

pH2.3 洗脱缓冲液：0.05mol/L 甘氨酸/0.15mol/L NaCl/0.02%（*m*/*V*）NaN_3，pH2.3

1. 将≥10mg 纯化后的 MAR18.5 抗体与溴化氰活化的琼脂糖凝胶 4B 共价偶联，1ml 湿凝胶约可以偶联 10mg 左右的 MAR18.5 抗体，此柱可结合 1mg 左右蛋白质（单元 12.2），将偶联的凝胶在 4℃或室温下用结合缓冲液冲洗。
2. 提纯腹水或 MAb 上清（见备选方案 1，步骤 1a 或 1b），将含大鼠抗体粗提液的 10ml 左右腹水或 100ml 左右 MAb 上清上样。
3. 用 10～15 倍柱体积的结合缓冲液洗柱，监测 A_{280} 值，使其回到基线水平，放置组分收集器准备收集洗脱液。
4. 分别用以下洗脱液各洗脱 5 个柱体积，在用下一个洗脱液之前要确定 A_{280} 已回到基线。
   pH7.0 洗脱缓冲液
   pH5.5 洗脱缓冲液（某些抗体会洗脱）
   pH4.3 洗脱缓冲液（多数抗体会洗脱）
   pH2.3 洗脱缓冲液（所有抗体会洗脱，洗到 A_{280} 回到基线）
5. 用≥10 个柱体积的结合缓冲液平衡层析柱，置于 4℃保存。
6. 鉴定洗脱的蛋白质峰（包括未结合的洗脱组分），合并各洗脱液，检测抗体活性，如有必要，可将其浓缩（见基本方案 1，步骤 6）。

参考文献：Hardy，1986

撰稿人：Sarah M. Andrew and Julie A. Titus

单元 1.6　免疫球蛋白 G（IgG）片段的水解

一个新的抗体需要片段化的时候往往要进行摸索性的试验。选择反应时间的时候宁可保留部分抗体不被完全降解，这样可以避免蛋白酶过分裂解后导致抗体结合位点的破坏。可以参考图 1.6.1 的抗体结构图，设计酶解片段的方法。

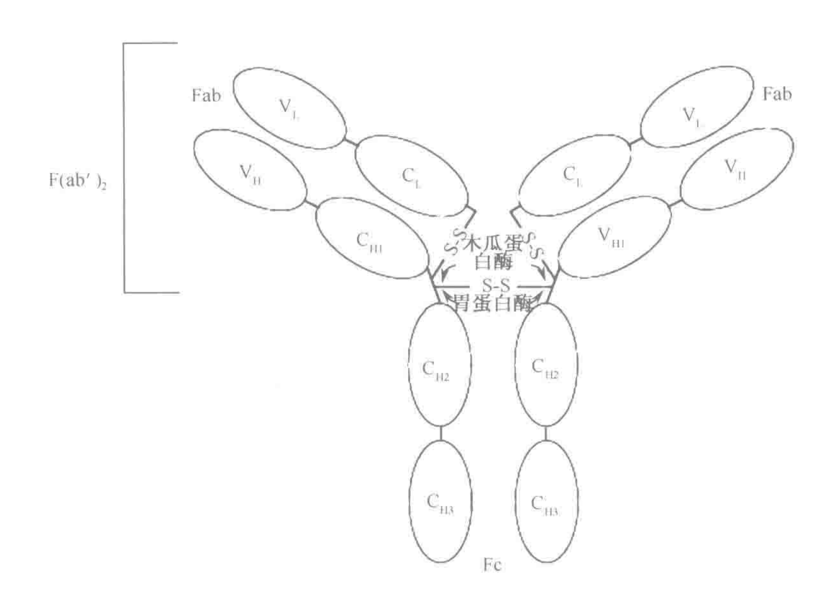


图 1.6.1　免疫球蛋白的蛋白酶水解片段。图中显示轻链的可变区和恒定区（V_L 和 C_L）以及重链的可变区和恒定区（V_H、C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}）和链间二硫键（S—S）。木瓜蛋白酶水解 IgG 后的单价片段称为 Fab，双价片段称为 F（ab)$_2$，胃蛋白酶水解 IgG 后的双价片段称为 F（ab′)$_2$，水解 IgM 后的双价片段称为 F（ab′)$_{2\mu}$。含有 Fab 和 Fc 的 IgM 双价亚单位称为 IgM_S（单体），含有单个抗原结合位点和一个完整 Fc 部分的 IgG 片段称为 Fab/c。

基本方案 1　木瓜蛋白酶水解 IgG 成 Fab 片段摸索性试验

此法适用于小鼠（任何亚类）、大鼠、人、山羊、绵羊、马、鸡、豚鼠和牛的 IgG 水解。

材料（带√项目见附录 1）

保存于 PBS（附录 1）中的 2mg/ml 纯化的 IgG（单元 1.5）
木瓜蛋白酶（2×结晶悬液；Sigma）
水解缓冲液：0.02mol/L EDTA（二钠盐）/0.02mol/L 半胱氨酸/PBS（新鲜配制，冰上保存<10h）
溶于 PBS 的 0.3mol/L 碘乙酰胺（从结晶体新鲜配制；Sigma）

√PBS

自制的微量透析槽或微量透析盒（如 Slide-A-lyzer 透析盒；Pierce）

1. 将 100μl 2mg/ml 纯化的 IgG 加入标有 1～24 的 24 个微量离心管中。充分混匀木瓜蛋白酶悬液，不能振荡。准备两种浓度木瓜蛋白酶，溶于 5ml 水解缓冲液中，浓度分别是 0.1mg/ml 和 0.02mg/ml。
2. 将 100μl 0.1mg/ml 木瓜蛋白酶液分别加入 8 个 IgG 离心管中（酶/抗体比例为 1∶20），将 100μl 0.02mg/ml 木瓜蛋白酶液分别加入第二组 8 个 IgG 离心管中（酶/抗体比例为 1∶100），最后，将 100μl 不含木瓜蛋白酶的水解缓冲液加入剩余的 8 个 IgG 离心管中（对照组），所有离心管盖上盖子。
3. 将所有离心管置于 37℃水浴，在不同时间取出一组离心管，制作水解时间曲线图。一组离心管指一个 E/A 比为 1∶20 的水解管，一个 E/A 比为 1∶100 的水解管和一个对照水解管。水浴 1h 时取出第一组离心管，接着在第 2h、4h、6h、12h、18h、24h 和 48h 分别取出第二至第八组离心管。取出一组离心管后每管加入 20μl 0.3mol/L 碘乙酰胺中止水解。
4. 用自制的微量透析槽或商品化的微量透析盒将水解混合物对 PBS 透析。
5. 用 150mm×1.5mm 10%非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（单元 12.3）分析水解产物，上样量为 80μl。当凝胶上在 150kDa（表示未水解的抗体）和 120kDa（表示仅半胱氨酸起作用）处没有显示蛋白质条带时，酶切反应完全。选择水解 IgG 获取 Fab 片段的最佳试验条件，按基本方案 2 进行试验。

   Fab 片段大小为 50kDa 左右，Fc 片段大小为 27kDa，在 24kDa 和 15kDa 处的细条带是一些不重要的水解产物。

基本方案 2　木瓜蛋白酶水解 IgG 获取 Fab 片段的大量制备

用摸索性试验的方法确定获取 Fab 片段的最佳试验条件（见基本方案 1）。

材料（带√项目见附录 1）

木瓜蛋白酶（2×重结晶悬液；Sigma）

水解缓冲液：0.02mol/L EDTA（二钠盐）/0.02mol/L 半胱氨酸/PBS（新鲜配制，冰上保存<10h）

溶于 PBS（附录 1）中浓度≥1mg/ml 的 IgG（总量≥5mg，单元 1.5）

碘乙酰胺结晶

√PBS，pH8.0

蛋白 A 交联琼脂糖凝胶 CL-4B

聚丙烯酰胺葡聚糖 S-200 Superfine（Pharmacia Biotech）

√硼酸盐缓冲液，可选

10%（m/V）NaN_3，可选

5mm×100mm 层析柱（Bio-Rad）

26mm×900mm 层析柱（Pharmacia Biotech）

1. 混匀木瓜蛋白酶悬液，避免振荡。加入与待水解抗体相等体积的水解缓冲液溶解木

瓜蛋白酶，选择从摸索性试验中已确定的最佳酶量、抗体浓度和孵育时间进行实验。

2. 将木瓜蛋白酶液加入浓度为≥1mg/ml 溶于 PBS 的 IgG 中，混匀，37℃水浴至所需时间（从基本方案 1 中确定）。加入结晶碘乙酰胺至终浓度 0.03mol/L 中止水解反应，小心混匀，确保碘乙酰胺完全溶解。
3. 将反应液转至透析袋中（CPI 附录 3H），在 4℃下对 2L PBS pH8.0 透析 12～20h。
4. 准备 5mm×100mm 蛋白 A 交联琼脂糖凝胶 CL-4B 层析柱（单元 1.5、CPI 附录 3I），将透析液上样。收集含有 Fab 片段和酶的未结合流穿液。如有需要，用 PBS 充分洗柱，收集所有 Fab 片段。
5. 将含有 Fab 片段的流穿液浓缩至≤5ml（CPI 附录 3H）。
6. 将浓缩液上样至 26mm×900mm 聚丙烯酰胺葡聚糖 S-200 Superfine 层析柱，收集分子质量大小为 50kDa 的组分，用 SDS-PAGE 法鉴定分子质量大小或使用预平衡的凝胶过滤层析柱。
7. 将 1～80μl 终产物用 10%非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳鉴定终产物的纯度。通过测定 A_{280} 值，确定 Fab 片段浓度（表 1.5.1）。将 Fab 片段保存在硼酸缓冲液中，于 4℃保存；或者保存在含 0.02% NaN_3 的 PBS 中，于－70℃保存。

基本方案 3　胃蛋白酶水解 IgG 成 F（ab′）$_2$ 片段的摸索性试验

在此试验中摸索在两个不同 pH 下 IgG 的水解情况，因为 IgG 在低 pH 下会水解成 Fab 片段或更小的片段。胃蛋白酶的水解比木瓜蛋白酶更剧烈，因此推荐的酶/抗体（E/A）比例以不超过 1∶20 为佳。

注意：从 IgG_{2b} 水解不能得到 F（ab′）$_2$ 片段，用胃蛋白酶水解 IgG_{2b} 会得到相同分子质量的片段（120kDa），但这些是 Fab/c 片段（含一个 Fab 片段和完整的 Fc 部分，图 1.6.1）。

材料（带√项目见附录 1）

3mg/ml 纯化的 IgG（单元 1.5）
pH4.0 和 pH5.0 乙酸缓冲液：0.2mol/L 乙酸钠，用冰醋酸调至所需 pH
0.1mg/ml 胃蛋白酶（Sigma）：溶于 pH4.0 乙酸缓冲液
0.1mg/ml 胃蛋白酶（Sigma）：溶于 pH4.5 乙酸缓冲液
2mol/L Tris 碱
√PBS

1. 将 2ml 3mg/ml 纯化的 IgG 分别对着 200ml 乙酸缓冲液（pH 分别为 4.0 和 4.5）透析，4℃透析 4h（CPI 附录 3H）。
2. 用对应 pH 的乙酸缓冲液作为空白对照测 A_{280} 值，确定两种透析后 IgG 的浓度（表 1.5.1），用对应 pH 的乙酸缓冲液将两种 IgG 水解液的浓度调至 2mg/ml。
3. 将 100μl 2mg/ml IgG pH4.0 加入 16 个标号的微量离心管中，将 100μl 2mg/ml IgG pH4.5 加入另外 16 个标号的微量离心管中。
4. 将 100μl 0.1mg/ml 胃蛋白酶液 pH4.0 加入 8 个 IgG pH4.0 离心管中，将 100μl 乙酸缓冲液 pH4.0 加入另外 8 个 IgG pH4.0 离心管中。将 100μl 0.1mg/ml 胃蛋白酶

液 pH4.5 加入 8 个 IgG pH4.5 离心管中，将 100μl 乙酸缓冲液 pH4.5 加入另外 8 个 IgG pH4.5 离心管中 [在两种不同 pH 溶液中酶/抗体（E/A）比例为 1∶20]。

5. 将所有离心管置于 37℃水浴，分别在 1h、2h、4h、6h、12h、24h 和 48h 时从四组各 8 个离心管中取出 1 个离心管，在取出的离心管中加入 40μl 2mol/L Tris 碱终止酶解反应。
6. 将水解液转至透析袋中，并准备微量透析槽，在 4℃下对着 1L PBS 透析 4h。
7. 用 10%非还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶（单元 12.3）进行电泳分析，每管上样量为 80μl，F（ab′)$_2$ 片段分子大小为 110kDa，较小分子质量（约 50kDa）的条带可能是 Fab′片段。从中确定获取最大量 F（ab′)$_2$ 片段的最佳条件，用于基本方案 4 中。

基本方案 4　胃蛋白酶水解 IgG 获取 F（ab′)$_2$ 片段的大量制备

从摸索性试验中确定抗体最佳水解条件（见基本方案 3），务必记住 IgG_{2b}不能水解成 F（ab′)$_2$ 片段。

材料（带√项目见附录 1）

≥1mg/ml 纯化的 IgG（单元 1.5）
适当pH 的乙酸缓冲液（见基本方案 3）：0.2mol/L 乙酸钠，用冰乙酸调至所需 pH
2mol/L Tris 碱
√PBS，pH8.0
蛋白 A 交联琼脂糖凝胶 CL-4B
半胱氨酸，可选
碘乙酰胺结晶，可选
聚丙烯酰胺葡聚糖 S-200 Superfine（Pharmacia Biotech）
√硼酸缓冲液，可选
10%（m/V）NaN_3，可选
5mm×100mm 层析柱（Bio-Rad）
26mm×900mm 层析柱（Pharmacia Biotech）

1. 将浓度≥1mg/ml IgG 对着合适 pH 的乙酸缓冲液（从基本方案 3 确定）透析，测定 A_{280}值确定 IgG 浓度（表 1.5.1）。
2. 加入合适 pH 的乙酸缓冲液配制 0.1mg/ml 胃蛋白酶，使得 E/A 比为 1∶20。将酶、抗体混合液置于 37℃至所需时间（从基本方案 3 确定），在每毫升反应液中加入约 50μl 2mol/L Tris 碱中止反应。如有需要，用 pH 试纸检测 pH 是否为 8.0，也可加入更多量 Tris 碱。
3. 将混合液转至透析袋中，4℃下对着 1L PBS pH8.0 的缓冲液透析。
4. 将透析液上样至 5mm×100mm 蛋白 A 交联琼脂糖凝胶 CL-4B 层析柱上（单元 1.5 和 CPI 附录 3I），收集未结合的流出液。
5. 可选：为了减少 F（ab′)$_2$ 水解成 Fab′，加入半胱氨酸至终浓度为 0.01mol/L，混匀，在 37℃下孵育 2h。如有必要进一步碱化，可以向混合液加入碘乙酰胺 0.15mol/L，用下述步骤纯化去除 Fab′片段。

6. 将流出液浓缩至≤5ml（CPI 附录 3H）。
7. 将浓缩液上样至 26mm×900mm 聚丙烯酰胺葡聚糖 S-200 Superfine 层析柱上，用紫外检测器或分光光度计检测洗脱下的蛋白质峰。用 SDS-PAGE 法或者预平衡的凝胶层析柱确定片段成分，收集分子质量大小为 110kDa 的组分。
8. 鉴定终产物的纯度，用 10%SDS 还原和非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳，上样量为 1～20μl。在非还原凝胶电泳上，$F(ab')_2$ 片段在 110kDa 处显示一条带，在还原凝胶电泳上，$F(ab')_2$ 片段在 25kDa 处显示为单一条带或为二聚体。
9. 测 A_{280} 值，确定 $F(ab')_2$ 片段浓度。在硼酸缓冲液中的 $F(ab')_2$ 片段可在 4℃保存，在含 10%（m/V）NaN_3 的 PBS 中的 $F(ab')_2$ 片段可在－70℃保存。

备选方案　用预先活化的木瓜蛋白酶水解 IgG 制备 $F(ab)_2$

此法可酶解 IgG_1 成 $F(ab)_2$ 片段。另外，从小鼠 IgG_{2a} 和 IgG_{2b} 获取 Fab 片段也可以用此方案。这是一种更温和且更稳定的酶解方案，可获得更多的酶解片段。

附加材料（其他材料见基本方案 4，带√项目见附录 1）

溶于 2～5ml PBS 中的 10mg IgG（单元 1.5）
√乙酸/EDTA 缓冲液，pH5.5
2mg/ml 木瓜蛋白酶溶于乙酸/EDTA 缓冲液中
0.05mol/L 半胱氨酸（无碱，结晶；Sigma）
碘乙酰胺结晶
PD-10 层析柱（Pharmacia Biotech）

1. 将溶于 2～5ml PBS 中的 10mg IgG 用乙酸/EDTA 缓冲液透析（CPI 附录 3H），用乙酸/EDTA 缓冲液作空白对照，测 A_{280} 值确定 IgG 浓度。
2. 将 2mg/ml 木瓜蛋白酶液和 0.05mol/L 半胱氨酸置于 37℃水浴 30min。
3. 用 20ml 乙酸/EDTA 缓冲液平衡 PD-10 层析柱（CPI 附录 3I），将木瓜蛋白酶/半胱氨酸上样，用乙酸/EDTA 缓冲液洗脱，收集 10 个 1ml 组分。
4. 测定组分 A_{280} 值，将 2 或 3 个包含木瓜蛋白酶的组分合并。按下列公式计算预活化的木瓜蛋白酶浓度。

$$A_{280}/2.5 = \text{mg 预活化的木瓜蛋白酶/ml}$$

将预活化的木瓜蛋白酶置于冰上保存，并在 2h 内使用。
5. 在透析好的 10mg IgG 溶液中加入 0.5mg 预活化的木瓜蛋白酶，振荡混匀，在 37℃水浴中水解 6～12h，加入碘乙酰胺结晶至终浓度 0.03mol/L 中止反应。
6. 在 4℃用 1L PBS pH8.0 透析 6～12h。
7. 用 PBS（pH8.0）平衡蛋白 A 交联琼脂糖凝胶 CL-4B 层析柱，上样，收集未结合的蛋白质，每组分 2ml，将出现在第一个峰的未结合组分合并（用紫外或分光光度计检测）。
8. 将未结合组分浓缩至≤5ml（CPI 附录 3H）。
9. 将浓缩液上样至凝胶过滤层析柱上，用紫外分光光度计监测组分的 A_{280} 值，收集 100 个组分（1%柱体积）。用 SDS-PAGE 确定包含所需片段的组分（单元 12.3），或者

用预平衡的凝胶过滤层析柱确定。硼酸缓冲液中的 F（ab）$_2$ 片段可在 4℃保存，含 0.02% NaN_3 的 PBS 中的 F（ab）$_2$ 片段可在 −70℃保存。

参考文献：Parham，1983

撰 稿 人：Sarah M. Andrew and Julie A. Titus

单元 1.7　免疫球蛋白 M(IgM)和免疫球蛋白 D(IgD)的纯化

基本方案 1　用透析和凝胶过滤层析法纯化 IgM

此法纯化的 IgM 可达到较好纯度，可用于酶解、异硫氰酸盐荧光素（FITC）标记、生物素标记或放射性标记。

材料（带√项目见附录 1）

腹水或单克隆抗体（MAb）上清（单元 1.4）
√PBS
Sorvall 离心机，SS-34 型转子（或类似转子）
透析袋
26mm×900mm 层析柱，填有适当凝胶过滤（SE）树脂（CPI 附录 3I）

1. 按单元 1.5 离心和去除 IgG 中脂类物质的方法纯化腹水上清，若是 MAb 上清，室温或 4℃，15 000g 离心 30min，去除细胞碎片，保留上清。
2. 将澄清的腹水或 MAb 上清转至透析袋中，在 4℃下用≥10 倍样品体积的蒸馏水透析 24h，在室温或 4℃下将透析好的溶液以 15 000～20 000g 离心 1h，弃去上清。
3. 将填有 SE 树脂的 26mm×900mm 层析柱用 PBS 平衡（CPI 附录 3I），用≤5ml PBS 溶解步骤 2 中的沉淀并上样，用 PBS 洗脱蛋白质并收集 100 个组分（1%柱体积）。
4. 测 A_{280} 值确定 IgM 浓度（表 1.5.1）。将含有纯 IgM 的洗脱液合并（第一个洗脱峰）。用 10%SDS 还原聚丙烯酰胺凝胶鉴定 IgM 纯度（单元 12.3）。视使用的凝胶装置而定上样量，为 1～80μl。电泳上 IgM 显示二条带，在 78kDa 处的重链带和 25kDa 处的轻链带。
5. 溶于 PBS 中浓度为 1～20mg/ml 的 IgM 可于 4℃或 −70℃（不能冻融）保存数月，若 IgM 出现沉淀，可用更高离子浓度的缓冲液再溶解（如加入 NaCl）。

备选方案 1　硫酸铵沉淀法纯化 IgM

此法适用于多数 IgM 抗体，尤其是一些在水中不能形成沉淀的 IgM 抗体。

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

√饱和硫酸铵（SAS）
硫酸铵结晶（CAS）
√硼酸缓冲液，可选

玻璃棉（Polyscience）

1a. 适用于腹水：为了清除腹水中的脂类物质，将足够玻璃棉置于漏斗中盖住漏斗口，倒入腹水，再用 PBS 冲洗玻璃棉，并戴好手套轻轻挤压玻璃棉，收集全部滤出液，将滤出液于 4℃或室温，20 000*g* 离心 30min，轻轻倒出上清，弃去沉淀。边搅拌边缓慢在上清中加入 SAS 至终浓度 45%（*V*/*V*），在 4℃静置 1～2h 或过夜，使所有蛋白质沉淀。

1b. 适用于 MAb 上清：将 MAb 上清于 4℃或室温，20 000*g* 离心 30min，轻轻倒出上清液，在上清液中加入下列量的 CAS：

$$\text{CAS (g)} = (0.45\ \text{倍上清液体积}) \times 76/100$$

2. 将沉淀于 4℃或室温，20 000*g* 离心 1h。保留上清，测其活性。用最少量 PBS 或硼酸缓冲液（10～20ml）溶解沉淀并转至透析袋中，用≥20 倍体积的 PBS 或硼酸缓冲液于 4℃透析 24～48h，在透析过程中更换透析缓冲液 4～6 次，透析完成后，将溶液浓缩至≤5ml（CPI 附录 3H）。

3. 用 SE 层析柱纯化 IgM 后分析保存（见基本方案 1，步骤 3～5）。

备选方案 2　甘露聚糖结合蛋白亲和纯化 IgM

甘露聚糖结合蛋白（MBP）可亲和纯化人和小鼠 IgM，此法也适用于其他物种的 IgM 纯化。

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

EDTA
1mol/L NaOH
腹水或单克隆抗体（MAb 上清）（单元 1.4）
超连接固定的甘露聚糖结合蛋白（MBP；Pierce）
结合缓冲液：0.1mol/L NaOH/0.5mol/L NaCl，pH8.3 分别于 4℃和室温保存
1.0mol/L 碘化钾
√PBS
1.5cm×10cm 层析柱或 50ml 离心管
MSE Mistral 3000i 冷冻离心机（或类似设备，仅供批量纯化使用），4℃或室温

1. 在腹水或 MAb 上清中加入 EDTA 至终浓度 10mmol/L，用 NaOH 调 pH 至 8.0。

IgM 层析纯化

2a. 将超连接固定的 MBP 溶于结合缓冲液中，填入 1.5cm×10cm 层析柱，在 4℃下用 20ml 结合缓冲液洗柱。注意：要在低温情况下结合 IgM。在 4℃下将腹水或 MAb 上清上样并保留 15min。柱子的结合力约为 1mg IgM/ml 固定的 MBP。

3a. 在 4℃下用结合缓冲液洗柱，将结合有 IgM 的层析柱移至室温并在室温下放置 1h。

4a. 让柱子自然流出缓冲液，收集流出液，每组分收集 1ml，收集 20～50 组分。将室温的结合缓冲液不断从层析柱顶部加入，防止层析柱流干。监测 A_{280} 值（表 1.5.1），用 SDS-PAGE 鉴定组分（单元 12.3）。

5a. 用一个柱体积的 1.0mol/L 碘化钾洗脱残留在层析柱上的 IgM，并与先前收集的组分合并，用 ELISA 检测抗体活性（单元 1.1）。

IgM 批量纯化

2b. 将 5～10ml 超连接固定的 MBP 倒入 50ml 离心管中，加入结合缓冲液至 40ml，4℃，1200*g* 离心 10min，留下约 2ml 上清，其余弃之。在 MBP 中加入腹水上清或 MAb 上清，混匀，于 4℃下静置 15min，在低温条件下结合 IgM，MBP 的结合力约为 1mg IgM/ml 固定的 MBP。

3b. 4℃下用结合缓冲液洗 IgM-MBP 混合液，4℃，1200*g* 离心 10min，倒掉上清，使基质中留有最少体积的结合缓冲液，在室温下静置约 1h。

4b. 1200*g* 离心 10min，收集上清，在沉淀中加入 1 倍柱体积的 1.0mol/L 碘化钾，1200*g* 离心 10min，收集上清，将二次上清合并。

MBP 可以反复使用 10 次。循环使用前必须去除碘化钾，然后用结合缓冲液重新平衡。

6. 将上清用 PBS 透析（CPI 附录 3H），以 1～20mg/ml 溶于 PBS 中，保存于 4℃或 −70℃。

备选方案 3　IgM 纯化试剂盒

可从 Pierce 或 Pharmacia 购买商品化试剂盒并按生产商指导使用。AbZorb 试剂盒（Pierce）包含足够的吸收剂和缓冲液，可纯化小鼠血清或腹水来源的 10mg IgM。E-Z-SEP 试剂盒（Pharmacia）可纯化澄清腹水、生物反应器培养上清、组织培养上清或血清中 IgM。这些试剂盒的使用请按照说明书进行。

基本方案 2　凝集素亲和层析法纯化小鼠 IgD

小鼠血清中的 IgD 浓度非常低（<1μg/ml），因此，通常从浆细胞瘤和杂交瘤中获取毫克数量级的 IgD。来源于 *Griffonia simplicifolia*-1（GS-I，以前称为 *Bandieraea simplicifdia*-1）的 α-吡喃乳糖结合凝集素与小鼠 IgD 特异、可逆结合，其他型小鼠 Ig 不能与此凝集素结合。

材料（带√项目见附录 1）

荷载产生 IgD 的小鼠浆细胞瘤（如 TEPC-1017）、分泌 IgD 的杂交瘤（如 B18-δ）或含 MAb 的培养上清
PBS-CA：含 1mmol/L $CaCl_2$ 的 PBS，pH7.0（冷藏）
脱脂（Delipidating）试剂（Beckman）或见单元 1.5
GS-I 凝集素交联琼脂糖凝胶（E-Y labs）
PBS-CA-GAL：含 0.1mol/L D-半乳糖的 PBS-CA，pH7.0（冷藏）
√PBS，pH7.3，冷藏
Sorvall 离心机，SS-34 型转子（或类似转子），4℃
1～50ml 层析柱

1. 从含浆细胞瘤或杂交瘤的小鼠中收集 IgD 腹水（单元 1.4 中基本方案 2，步骤 1～9）。尽量使用新鲜收集的腹水，不能冻融。对于 MAb 培养上清，4℃，20 000*g* 离心 30min，弃去细胞沉淀，保留上清。
2. 在腹水中加入 9 倍体积的预冷 PBS-CA 缓冲液，4℃，20 000*g* 离心 30min，收集上清并按使用说明加入脱脂试剂或使用单元 1.5 方案（见基本方案 1，步骤 1a），收集水相。对于 MAb 培养上清，用 PBS-CA 缓冲液按 1∶10 稀释。
3. 在 4℃冷室里，准备 1～5ml GS-I 凝集素交联琼脂糖凝胶层析柱（CPI 附录 3I），并分别用 10 个柱体积的下述预冷缓冲液按顺序洗柱：

   PBS-CA、PBS-CA-GAL、PBS-CA。
4. 将腹水或 MAb 上清上柱，流速为<1ml/min [约 0.5ml/（min · cm^{-2}）]，以后步骤中都用此流速。

   凭经验确定样品和层析柱的最佳结合比例，先试用 2∶1 的比例。在预试验中可以用 ELISA 法测定流出液（单元 1.1），以确定层析柱的结合力是否已达到饱和。
5. 用预冷的 PBS-CA 缓冲液洗柱，监测流穿组分和接下来的洗出液的 A_{280} 值，直到 A_{280} 回到基线，若 A_{280} 不能快速回到基线，则表明层析柱有可能超载。
6. 用预冷的 PBS-CA-GAL 缓冲液洗脱 IgD，确定洗脱体积，监测洗脱物质的吸收值，直到 A_{280} 回到基线。通常，需要 2～5 倍柱体积的 PBS-CA-GAL 洗脱液。
7. 洗脱下的样品于 4℃对 1L 预冷的 PBS（pH7.3）进行透析（CPI 附录 3H），期间更换透析液 3 次。
8. 测 A_{280} 值，确定 IgD 浓度。用 10%SDS 还原聚丙烯酰胺凝胶电泳判断 IgD 纯度（单元 12.3），用 PBS 配成浓度为≥1mg/ml 的 IgD 于－70℃保存（不要冻融）。
9. 用 1 倍柱体积的预冷 PBS-CA-GAL 缓冲液洗柱，接着用 10 倍柱体积的 PBS-CA 缓冲液洗柱以再生柱子。用含 0.02% NaN_3 的 PBS-CA 缓冲液保存柱子，4℃下可保存 1 年（超过这个时间柱子的结合力减弱 50%左右）。再次使用前请按步骤 3 重新平衡柱子。

撰 稿 人：Sarah M. Andrew，Julie A. Titus，Richard Coico，and Ashok Amin

单元 1.8　抗体可变区（V 区）的克隆、表达和修饰

基于 PCR 的克隆方案利用了可变区中框架区和先导区的保守序列，尽管用框架区中的保守序列可合成引物，用于克隆可变区，但会引起框架区中氨基酸的改变，从而影响抗原结合。因此，用保守的疏水先导序列合成引物是比较好的方案。图 1.8.1 是此方案的概括。



图 1.8.1　免疫球蛋白 V 区克隆和表达流程图。

基本方案 1　通过使用冗余引物克隆和表达免疫球蛋白可变区

注意： 高压灭菌所有接触 RNA 的器械和容器，并用 DEPC 处理过的水冲洗。实验过程中一直戴手套。所有用于 RNA 的水和盐溶液都用 DEPC 处理（附录 1）。

材料（带√项目见附录 1）

5×10^5 个来自能生产抗体的杂交瘤细胞株的细胞（单元 1.3）
√PBS
液氮，可选择的
√异硫氰酸胍溶液
√2mol/L 乙酸钠，pH4
√水饱和的酚
49：1（*V*/*V*）的氯仿/异戊醇
100%和 70%（*V*/*V*）的乙醇，−20℃
√二乙基焦碳酸（DEPC）处理过的水
1mg/ml 用于 cDNA 合成的 3′端引物（表 1.8.1）
√cDNA 第一链缓冲液
50U/μl RNA 酶抑制剂（RNasin；Promega）
10mmol/L 4dNTP 溶于水的混合物

表 1.8.1 用于 cDNA 合成和抗体序列的扩增的 3′端引物

免疫球蛋白区域	PCR 引物	引物序列[a]
轻链恒定区	Oligo dT. R1. XBA. H3	5′-GCCGGAATTCTAGAAGC (T)$_{17}$-3′
轻链恒定区	MC_kAS. XBA[b]	5′-GCGTCTAGAACTGGATGGTGGGAGATGGA-3′
重链可变区	MgC. C_H1AS[c]	5′-AGGTCTAGAA (C/T) CTCCACACACAGG (A/G) (A/G) CCAGTGGATAGAC-3′

a. 存在兼并性的核苷酸，已经在某位置用可替换的核苷指出。底下画线的是 *Xba*I 克隆位点。

b. 能与鼠科动物 κ 恒定区的氨基酸 122～116 的编码序列杂交的序列。

c. 能与小鼠除 IgG_3 的免疫球蛋白中 C_H1 中的氨基酸 130～120 的编码序列杂交的反义引物。

9.5U/μl 禽成髓性白血病病毒（AMV）反转录酶（Promega），1/10 稀释于反转录酶缓冲液（附录 1）

20μmol/L 针对小鼠的重链和轻链可变区的上游引物（表 1.8.2 和表 1.8.3）

表 1.8.2 扩增鼠重链可变区引导区域的 5′端正义引物

PCR 引物[a]	引物序列[b]
MHALT1. RV	5′-GGGGATATC**CACC**TAGG(A/G)ATG(C/G)AGCTG(T/G)GT(C/A)AT(C/G)CTCTT-3′
MHALT2. RV	5′-GGGGATATC**CACC**TAG (A/G)ACTTCGGG(T/C)TGAGCT(T/G)GGTTTT-3′
MHALT3. RV	5′-GGGGATATC**CACC**TAGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT-3′
MHALT4. RV	5′-GGGGATATC**CACC**TAGG(A/G)CAG (G/A)CTTAC(T/A)AT(C/T) (T/C)-3′

a. 设计的 3′端引物为可以同重链引导序列的氨基末端杂交的。所有引物同时应用，用于扩增未知序列。

b. *Eco*RV 位点（画线处）被 5′端的三个鸟嘌呤保护。核糖体结合位点用黑体表示。简并性核苷酸在某位置用可替换的核苷标出。

表 1.8.3 扩增鼠轻链可变区引导区域的 5′端正义引物

PCR 引物[a]	引物序列[b]
MHALT1. RV	5′-GGGGATATC**CACC**ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT -3′
MHALT2. RV	5′-GGGGATATC**CACC**ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAG-3′
MHALT3. RV	5′-GGGGATATC **CACC**ATG(G/A)AGTCACA(G/T)AC(T/C)CAGGTCTT(T/C)(G/A)TA-3′
MHALT4. RV	5′-GGGGATATC **CACC**ATGAGG(G/T)CCCC(A/T)GCTCAG(C/T)TC/T()CT(T/G)GG(G/A)-3′
MHALT5. RV	5′-GGGGATATC**CACC**ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3′
MHALT6. RV	5′-GGGGATATC**CACC**ATGATGAGTCCTGCCCAGTTCC-3′

a. 设计的 6 个引物为可以同鼠轻链引导区域的氨基末端杂交的。所有引物同时应用，用于扩增未知序列。

b. *Eco*RV 位点（画线处）被 5′端的 3 个鸟嘌呤保护。核糖体结合位点用黑体表示。简并性核苷酸在某位置用可替换的核苷标出。

2U/μl *Taq* DNA 聚合酶

1.25mmol/L 4dNTP 溶于 TE：每种 dNTP 浓度为 1.25mmol/L 并溶于 TE 缓冲液中，pH7.5（附录 1）。分装成 1ml/支，在－20℃可以保存 1 年。

√10×PCR 扩增缓冲液

石蜡油

氯仿

TA 载体（见辅助方案；也可从 Invitrogen 购得）

1 Weiss U/μl T4 DNA 连接酶和 2×T4 DNA 连接酶缓冲液（GIBCO/BRL）
感受态 *E. coli* 细胞（CPI 附录 3N）
20μmol/L J 区引物（表 1.8.4）

表 1.8.4 扩增和克隆鼠可变区的 J 区引物

PCR 引物	引物序列[a]
重链 J 区[b]	
J_{H1}	5′-GGGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT-3′
J_{H2}	5′-GGGGCTAGCTGAGGATACGGGAACCGTGGT -3′
J_{H3}	5′-GGGGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGT -3′
J_{H4}	5′-GGGGCTAGCTGAGAAGACGGTGACTGAGGT-3′
J_{H5}	5′-GGGGCTAGCTGAGGAGACTGTGACCATG-3′
轻链 J 区	
VLJ 1,2,4 反义[c,d]	5′-GGGGCTAGCTTACGTTT(T/G)ATTTCCA(G/A)CTT(G/T)GTCCC -3′
VLJ 5 反义[d,e]	5′-GGGGCTAGCTTACGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCCC-3′
VLJ6 反义	5′-GGGGCTAGCTTACGTTTCAATTCCAGCTTGGTG -3′

a. 简并性核苷酸在某位置用可替换的核苷酸标出。
b. *Nhe*I 位点（下画线处）用于克隆进入表达载体。
c. $J_\kappa 1$，$J_\kappa 2$ 和 $J_\kappa 4$ 的引物；不会引起氨基酸改变。
d. *Sal*I 位点（下画线处）用于克隆进入表达载体。
e. $J_\kappa 5$ 和 $J_\kappa 3$ 的引物是假基因。

用于 PCR 克隆的重链和轻链可变区的表达载体（图 1.8.2 和图 1.8.3）
用于筛选的加入适当抗生素的 LB 平板（CPI 附录 3N）
室温和 4℃微量离心机
16℃、42℃、60℃水浴
0.5ml 微量离心管
PCR 仪

1. 用微量离心机将 5×10^5 个生产抗体的杂交瘤细胞在最大转速离心 30s。弃上清，将细胞沉淀重悬于 1ml PBS 中，重复离心。再用 PBS 洗一遍。如果有必要的话，将沉淀迅速冻于液氮中，然后转移至－70℃中备用。
2. 在细胞沉淀中加入下列液体，每加一次都颠倒混匀，然后冰浴 15min。
   0.5ml 异硫氰酸胍溶液
   50μl 的 2mol/L 乙酸钠，pH4
   0.5ml 水饱和酚
   100μl 49∶1 的氯仿/异戊醇
3. 4℃，最大转速离心 20min。将上清（水相）层吸至另一干净的 1.5ml 离心管中。加入 2 倍体积的－20℃ 无水乙醇沉淀 RNA。样品在－70℃孵育 15min 以上（最好过夜），然后 4℃，最大转速离心 10min。弃上清。
4. 加入 200μl －20℃ 70％乙醇，短暂的混匀重悬沉淀，然后 4℃，最大转速离心 10min。弃上清，用乙醇再洗一次。晾干 RNA 沉淀或冷冻干燥 1～2min。将沉淀用

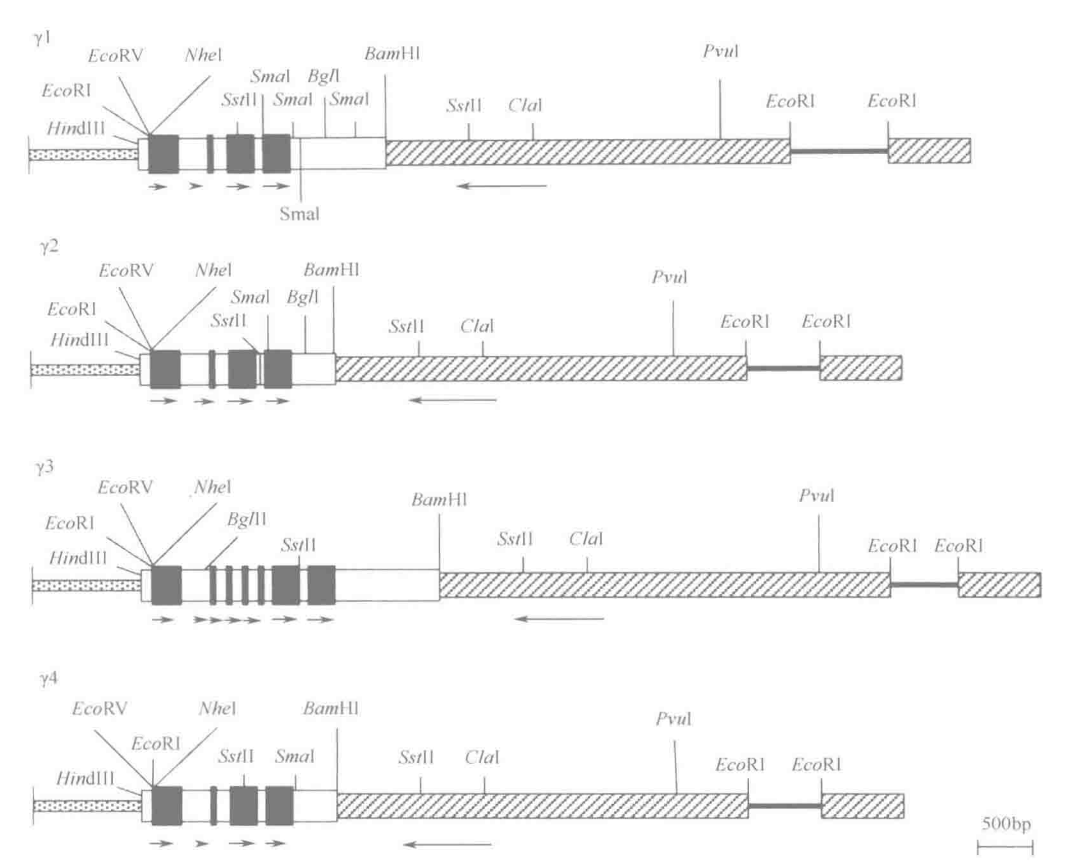


图 1.8.2　表达通过 PCR 克隆获得的重链（H）可变区（V）和人 γ 链恒定区（C）的载体。填充的黑框表示人重链基因的外显子。选择性限制性内切核酸酶位点在图上多接头位置内标示出，其中包括 *Eco*RV 和 *Nhe*I 克隆位点，外显子下方的箭头标示了转录的方向。表达载体在 *Bam*HI 位点被线性化，用来表达人基因序列 3′端的另一个 *Bam*HI 位点也已标示出。此外标示出的 *Pvu*I 位点位于 Amp 抗性区内，通常也可用来线性化表达载体。真核的选择性标志在构建图下方用一箭头标示，箭头方向代表了转录的方向。小鼠非编码区用点描的线条表示，启动子的位置用细线条标示。人非编码区用空白的框表示。位于 *Eco*RI 克隆片段处的小鼠重链增强子用细线标示。*Nhe*I 和 *Bam*HI 位点通常用来交换恒定区。

20μl DEPC 处理过的水重悬。

5. 加入 9μl RNA 到 2μl 浓度为 1mg/ml 用于合成 cDNA 的 3′端引物中，在 60℃孵育 10min。将样品放在冰上冷却。开始 cDNA 合成反应（反应总体积为 20μl）。

　　4μl 第一条链 cDNA 缓冲液；

　　1μl 50U/μl RNA 酶抑制剂；

　　2μl 10mmol/L 4 种溶于水的 dNTP 混合物；

　　2μl 稀释过的禽成髓细胞瘤病毒（AMV）反转录酶。

　42℃孵育 1h 后立即用于 PCR 合成 cDNA 或将其保存在－20℃。

6. 加 2μl 上述合成的 cDNA 和 5μl 合适的小鼠轻链或重链可变区引物至 0.5ml 的微量离心管中，两种引物应等量。

轻链载体

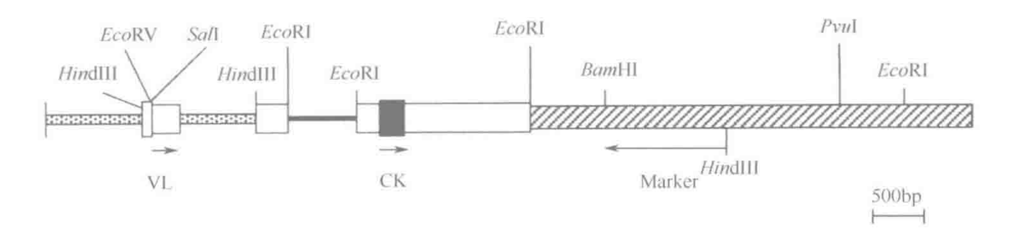


图 1.8.3　表达 PCR 获得的轻链（L）可变区（V）序列的载体。真核的选择性标志在序列下方用一箭头标示，箭头方向代表了转录的方向。序列的来源和功能在图 1.8.2 的重链表达载体中有描述。融合了引导序列的小鼠轻链可变区序列用空白的框表示。通过 *Eco*RV 和 *Sal*I 酶切替代可变区序列可改变载体的特异性。载体下方箭头表示免疫球蛋白编码区的转录方向。人轻链增强子区域用细线表示。此外也标明了选择性限制性内切核酸酶位点。

按顺序加入下列成分：

0.5μl 2U/μl *Taq* DNA 聚合酶；

16μl 1.25mmol/L 溶于 TE 中的 4 种 dNTP 混合溶液；

10μl 10×PCR 扩增缓冲液。

补水至终体积 100μl。用 2 滴（约 100μl）石蜡油覆盖反应混合物。

另外，当第一次尝试对未知序列进行扩增，可以设置一系列单独的反应，每次使用一个不同的上游引物。这主要考虑到对可变区不同家族的单独扩增可以提供所选细胞株使用哪个家族的信息，尤其是对 V_L 的扩增和降低存在于大多数杂交瘤细胞系中异常的轻链转录的问题是很有用的，对一些细胞株中的重链的扩增也是很有用的。

7. 在 PCR 仪中用下列的扩增循环程序进行 PCR。

30 个循环：	60s	94℃（变性）
	60s	55℃（复性）
	60s	72℃（延伸）
1 个循环：	10min	72℃（延伸）。

8. 将 10μl PCR 产物在 1.5%～2%的琼脂糖胶上电泳，用溴化乙锭染色，观察 PCR 产物的片段大小同预计的是否一致（CPI 单元 10.4）。使用引导和恒定区引物扩增的轻链的正确产物大小约 380bp，重链可变区的约 420bp。
9. 加入等体积氯仿到 PCR 产物中，颠倒混匀，最大转速离心 1min，把最上面一层液体吸至另一干净离心管中。按照实验需要可以在提取前或提取后将样品放在 4℃保存。
10. 在 0.5ml 的微量离心管中进行连接反应（总体积在 16μl），包含：

    3μl PCR 产物；

    50ng TA 载体；

    8μl 2×T4 DNA 连接酶缓冲液；

    加水至 15μl。

1μl 1U/μl T4 DNA 连接酶。

16℃孵育过夜。

11. 用 5μl 连接反应液转化 *E. coli* 感受态细胞（CPI 附录 3N）。挑取大约 12 个克隆，通过小量碱裂解法制备 DNA（CPI 单元 10.3）。用合适的限制性内切核酸酶（CPI 单元 10.8）消化 DNA，在 2%的琼脂糖胶上电泳，证明插入片段大小正确。
12. 为了证实引导序列和 J 区共有序列以及排除 V_H和（或）V_L PCR 错误，可以对片段大小正确的来自不同 PCR 样品的单个克隆的双链进行测序（单元 10.25）。
13. 针对表达载体选择一个针对确切的 J 区序列和包含适当的克隆位点（*Sal*I 针对轻链，*Nhe*I 针对重链）的引物。用克隆匹配的引导引物、带有适当的限制酶位点的新的 J 区引物，和来自正确可变区的 DNA 进行 PCR 扩增该克隆（步骤 6～11）。对 PCR 产物测序。
14. 对表达载体和包含正确可变区的质粒进行 DNA 的小量和大量制备（单元 10.3）。用适当的限制性内切核酸酶酶切表达载体。酶切产物在琼脂糖胶上电泳，纯化出大小正确的片段。

    因为重链载体在酶切后只释放出来一个多接头小片段，因此此小片段在胶上会随着全长线性产物迁移。轻链载体包含一个可变区，这个可变区将被酶切下来。
15. 用适当的限制酶酶切包含克隆的可变区的质粒（重链用 *Eco*RV 和 *Nhe*I，轻链用 *Sal*I），从琼脂糖胶中纯化出包含可变区的 DNA 片段。
16. 按摩尔比 1∶3 的比例混合载体和插入片段，加入 0.5ml 微量离心管中。加入 10μl 2×T4 DNA 连接酶缓冲液，加水至终体积 20μl。室温孵育 1h 或 16℃孵育过夜。用部分连接酶混合物转化 *E. coli* 感受态细胞。接种在 LB 抗性平板上，37℃孵育过夜。
17. 挑 6 个或更多克隆，从每一个克隆中制备 DNA。用适当的限制酶酶切，通过琼脂糖凝胶电泳来证明质粒结构正确。如果正确，用此载体转染真核细胞（CPI 单元 10.17B）。

辅助方案 TA 载体的制备

TA 质粒通常可以从 Invitrogen 购买到。

材料（带√项目见附录 1）

含平端限制酶酶切位点的质粒（如 pBluescript、Stratagene 或 pUC）
适当的限制酶（如 *Eco*RV 或 *Sma*I）
1∶1（*V/V*）的酚/氯仿
无水乙醇，−20℃
70%乙醇（*V/V*）/3mol/L 乙酸钠，pH4.8（附录 1）
√5×的末端转移酶（TdT）缓冲液
25mmol/L 二氯化钴（$CoCl_2$）
5mmol/L 3′，5′-双氧脱腺苷-5′-三磷酸（ddTTP）
25U/μl TdT

√TE 缓冲液，pH7.5

0.5ml 微量离心管

1. 根据载体的操作手册，在 0.5ml 微量离心管（单元 10.8）中，用限制酶裂解总体积 100μl 中 5μg 质粒，酶切后的质粒为平端。将 5μl 酶切产物行 0.6%的琼脂糖胶（单元 10.4）电泳，以确认质粒已经完全裂解。
2. 加入 100μl 体积比 1∶1 的酚和氯仿混合液，混匀，最大转速离心 1min，将上层液吸至新的离心管中。加入 200μl－20℃无水乙醇，混匀，－20℃孵育 2h。最大转速离心 5min。弃上清。
3. 加入 200μl 70%乙醇/3mol/L 乙酸钠。简单混匀，最大转速离心 1min。弃上清，晾干或冷冻干燥沉淀。用 22μl 水重悬，进行加尾反应（共 38.4μl），依次序加入：

    8μl 5×的末端转移酶（TdT）缓冲液；

    2.4μl 25mmol/L 二氯化钴（$CoCl_2$）；

    4μl 5mmol/L 3′，5′-双氧脱腺苷-5′-三磷酸（ddTTP）；

    4μl 25U/μl TdT。

    37℃孵育 1h。
4. 加入 60μl 水，抽提和沉淀 DNA（步骤 2）。沉淀重悬于 50μl TE 缓冲液中。分装成 10μl 一管存放于－20℃。

基本方案 2　用 ELISA 法鉴定转染细胞分泌的抗体分子

材料（带√项目见附录 1）

将 5～10μg/ml 羊抗人抗体（或其他合适的抗体或抗血清）溶于 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液（15mmol/L 碳酸钠/35mmol/L 碳酸氢钠），pH9.6（存放不要超过 2 周）

√PBS

封闭液：加入含 3%（m/V）BSA 的 PBS

含 1%（m/V）BSA 的 PBS

转染细胞培养上清（单元 10.17B）和阳性对照抗体（如 10μg/ml 人 IgG）

碱性磷酸酶标记的羊抗人 κ 或 λ 链抗体

底物：溶于 0.9mol/L 二乙基亚硝胺的 0.6mg/ml 对硝基苯磷酸/0.24mmol/L 二氯化镁，pH9.8

96 孔 ELISA 板（如 Immunlon 2；Dynatech Laboratories 公司）

酶联仪

1. 在 96 孔 ELISA 板中每孔加入 50μl 5μg/ml 的羊抗人抗体。用胶带或封口膜封口，37℃孵育 2h 或 4℃孵育过夜。在水槽中弃去多余的包被液，用 PBS 冲洗板，再弃去液体。用 PBS 洗 2 次以上。
2. 每孔加入 100μl 的封闭液。用胶带或封口膜封口，室温孵育 1h 或 4℃孵育过夜。在水槽中弃去多余的封闭液，用 PBS 洗板 3 次后，立即使用该板，或者在每孔加入 100μl 的 1% BSA 的 PBS，用胶带或封口膜把板封起来，4℃可以存放几个月以上（不要让板干掉）；在使用前用 PBS 洗 3 遍即可。

3. 将转染细胞培养上清加入已包被的酶标板的孔中，每孔加入 50μl。如果是要筛选一整块酶联板的样品，最好用多道移液器加样，加样过程中使用同样的移液器枪头。在吸取细胞培养上清时注意不要把底部的细胞吸起。在对照孔中加入 50μl 浓度 5～10μg/ml 的阳性对照抗体。将酶联板在 4℃孵育过夜。在水槽中弃去未结合的上清，用 PBS 冲洗板 3 次去除未结合的蛋白质。
4. 用 1% BSA 的 PBS 稀释碱性磷酸酶标记的羊抗人 κ 或 λ 链抗体至适当的浓度（根据抗体说明书，稀释 1：500～1：10 000）。（可选择性地使用对重链特异性的抗血清来结合 Ig。）每孔加入 50μl 稀释的抗体，37℃孵育 1～2h 或室温孵育 3h。在一个孔中加入 10μg/ml 的人 IgG 作为阳性对照。
5. 用 PBS 洗涤 6 遍去除未结合的抗体。加入 50μl 底物，在室温孵育 15min～3h，立即在酶联仪上测定 OD_{405} 值。辨别显示阳性反应的孔，检查转染细胞培养皿中是否有克隆存在。如果克隆很小，而引起的阳性反应却很强（也就是高表达的克隆），认为是理想的克隆。

基本方案 3　转染细胞分泌抗体分子的鉴定

警告：本实验只能由受过培训且能正确使用同位素 ^{35}S 的人员操作，且只能在 NRC 批准的地方进行。要时刻注意防止过量暴露和对人员及器械的放射性污染。合理处理实验废物。

材料（带√项目见附录 1）

1×10^6 个指数生长期的转染细胞（单元 10.17B）
标记培养基：不含甲硫氨酸的高糖 DMEM（Irvine Scientific）
0.01mCi/μl [^{35}S] 甲硫氨酸（>1000Ci/mmol）
FCS，仅用于过夜标记
√NDET 溶液
抗免疫球蛋白多克隆抗体（如兔抗-Ig）
IgG 吸附剂（The Enzyme Center）
蔗糖分离液：含30%(*m*/*V*) 蔗糖/0.3%(*m*/*V*) SDS(附录1)的 NDET 溶液(可选)
含 0.3%（*m*/*V*）SDS 的 NDET 溶液（可选）
√用于 Phosphate 凝胶的 SDS-PAGE 上样缓冲液
√5 %的 Phosphate 凝胶
√Phosphate 凝胶电泳缓冲液
合适的分子质量标记
√Phosphate 凝胶染色液
脱色液：7%（*m*/*V*）冰乙酸/5%（*m*/*V*）甲醇（室温放置）
1mol/L 的水杨酸盐，仅用于增强的放射自显影
0.15mol/L 2-巯基乙醇（2-ME）
15ml 无菌聚苯乙烯离心管
4℃的 IEC 离心机（或相等的）

水浴锅

Whatman 3MM 滤纸

1. 将 1×10^6 个指数生长期的转染细胞置于 15ml 无菌离心管中，4℃，220g 离心 5min。如果表达量低或需要多次分析的话就多加一些细胞。吸取或小心倒去离心管中的培养基。加入 5ml 标记培养基，离心。重复洗涤一次。
2. 将洗涤过的细胞用 1ml 含 10～25μCi [^{35}S] 甲硫氨酸的标记培养基重悬。细胞在 37℃培养箱中培养 3h 或培养过夜。如需要过夜标记，则可以加入 1%FCS。
3. 细胞 4℃，220g 离心 5min。小心地把上清吸至 1.5ml 微量离心管中，待分析。4℃存放。
4. 在细胞沉淀中加入 0.5ml NDET 溶液，将细胞裂解液吸至 1.5ml 微量离心管中。最大转速将细胞悬液离心 1min，将上清（细胞质裂解液）吸至另一干净离心管中。
5. 在步骤 3 取得的上清和步骤 4 取得的细胞质裂解液上清中分别加入 2.5μl 抗免疫球蛋白多克隆抗体，用于沉淀经放射性同位素标记的产物。冰浴 1h。加入 50μl IgG 吸附剂，冰浴 15min。
6. 将上述样品用 Pasteur 滴管加在 1ml 蔗糖分离液上。以最大转速离心 1min，轻轻倒出上清。分离较快但相对不太纯的免疫沉淀复合物无需过蔗糖分离液，可以直接将 IgG 吸附剂沉淀物以最大转速离心 1min 即可。加入 0.5ml 含 0.3%SDS 的 NDET 溶液，颠倒使沉淀完全重悬。
7. 最大转速离心 1min。弃上清，将离心管倒放在纸上，完全晾干。加入 0.5ml 水，重悬沉淀，再次离心。
8. 加入 50μl SDS-PAGE 上样缓冲液，轻轻颠倒使沉淀重悬，在沸水浴中孵育 2min，使免疫复合物从 IgG 吸附剂上分离下来。最大转速离心 2min。将含有放射性同位素标记的免疫沉淀物上清吸至另一干净离心管中，不要混有沉淀。
9. 将一半样品在 5% 的 Phosphate 凝胶中用磷酸胶电泳缓冲液电泳，电流为 100～150mA。使用合适的分子质量标记，电泳至溴酚蓝离凝胶底部约 1cm 处为止（单元 12.3）。
10. 每块胶需要用约 3 倍体积的染色液，轻轻摇动染色 10min（单元 12.4）。将胶浸泡在脱色液中，轻轻摇动至少 1h（或过夜）。

11a. 常规放射自显影：将胶放在 Whatman 3MM 滤纸上，用干胶机烘干。室温下在 X 射线片上曝光显影（CPI 附录 3J）。

11b. 增强自显影（放射活性小于 3000cpm 使用）：先用水冲洗胶，用 3 倍胶体积的 1mol/L 的水杨酸盐孵育 30min，将胶放在 Whatman 3MM 滤纸上，用干胶机烘干。－70℃下在 X 射线片上曝光显影（CPI 附录 3J）。

12. 在剩余样品（20μl；步骤 9 剩余的）中加入 5μl 的 0.15mol/L 2-巯基乙醇（2-ME），轻轻颠倒混匀。将上清上样于 12% 的 Tris-Glycine（Laemmli）胶上，用 Tris-Glycine 胶电泳缓冲液（单元 12.3），电泳，电压为 150V，直到溴酚蓝离胶底部约 1cm 处止。

参考文献：Holton and Graham，1990；Larrick *et al.*，1989

撰 稿 人：Sherie L. Morrison

单元 1.9 核酸免疫

实验策略

质粒载体

事实上，任何真核表达载体都可用于免疫，但最好的免疫反应通常是使用高表达抗原的载体实现的。将高表达抗原的载体靶向注射到特定的细胞腔隙中，或多或少的可以诱导特异的免疫反应。常用的载体通常包含一个强启动子，如巨细胞病毒即时早期启动子和一个强聚腺苷酸化序列，牛生长激素或兔β-珠蛋白信号（表 1.9.1）。巨细胞病毒即时早期启动子有两种：含有内含子 A 和不含有内含子 A 的。内含子 A 序列能够增加很多抗原的表达量。通常，含有内含子 A 的载体适用于不含有内切位点的序列。选择性标记和疫苗插入片段的相对方向会影响抗原的表达量，同样载体的大小也会影响抗原表达；很大（≥15kb）的载体应该避免使用，因为可能会导致表达效率低下。对于人的疫苗，美国食品药品监督局（FDA1996 年）推荐的表达载体为：卡那霉素抗性，去除了致瘤病毒的序列，以及与人类同源性最小。

表 1.9.1 在 DNA 疫苗中成功使用的表达载体

名称	启动子[a]	聚腺苷酸化[b]	抗生素选择性[c]	SV40 来源	其他[d]	来源
pVR1012	CMVIA	BGH	卡那	否	多克隆位点	VICAL
pVR1020	CMVIA	BGH	卡那	否	tPA 前导序列，多克隆位点	VICAL
pNGVL3	修饰的 CMVIA	兔 β-珠蛋白	卡那	否	多克隆位点	Vector Core Lab
pNGVL5	修饰的 CMVIA	兔 β-珠蛋白	卡那	否	IL-2 分泌信号多克隆位点	Vector Core Lab
pNGL7	修饰的 CMVIA	兔 β-珠蛋白	卡那	否	tPA 引导序列，多克隆位点	Vector Core Lab
pJW4303	CMVIA	BGH	氨苄	是	tPA 引导序列	James I. Mullins，Dept. of Microbiol.，Univ. of Washington，Seattle
pcDNA3	CMVIA	BGH	氨苄	是	T7 和 Sp6 RNA 启动子，f1 来源，新霉素抗性基因	Invitrogen

a. 定义：CMVIA，CMV 包含内含子 A 的即时早期启动子，修饰的 CMVIA，内含子 A 有一个 55bp 的缺失片段；CMV，CMV 即时早期启动子，没有内含子 A。

b. BGH，牛生长激素聚腺苷酸化信号。

c. 卡那，卡那霉素抗性；氨苄，氨苄青霉素抗性。

d. tPA，组织纤溶酶原激活因子引导序列。

发展新的载体或者在现有的载体中比较它们的效率，应该引入剂量-反应研究，这样在曲线图表的动态区域中可以很好地区别平台期反应。剂量-反应研究应用于精确定量表达量的测定、免疫刺激检定和免疫原性试验。这些关键研究对于稀释度大的 DNA（5～10 倍稀释）是最有用的。

DNA 提取

DNA 可以在许多细菌株中生产。对于插入的 DNA 片段不稳定的载体，建议使用 HB101 或者 Stb12（Life Technologies），培养过程中，要降低培养温度和降低通气（即减少搅拌），并且是小量培养。大规模的质粒纯化可以通过氯化铯梯度法（单元 10.3 和 CPI 附录 3N）或购买商业化的 DNA 纯化试剂盒（如 Qiagen）来完成。在测试免疫刺激活性的试验中，要尽量避免内毒素污染。内毒素的含量可以通过 LAL 法（Assoicates of Cape Cod）测定。无内毒素污染的 DNA 可以用商业化的抽提试剂盒制备，如去除内毒素的抽提试剂盒（Qiagen）。

免疫剂量及时间安排

在免疫研究中，我们使用与实际一样的 DNA 剂量和免疫间隔时间。通过肌肉和皮内注射进行免疫，一般一只小鼠注射 100μg DNA，一只猴子注射 1mg DNA。使用基因枪接种，一只小鼠需接种 2 点，每点接种 1μg DNA，而接种一只猴子需冲击 8 点以上，每点 1μg。基因枪粒子冲击的条件应该按照不同的种属进行最优化（见辅助方案 3）。在小鼠和猴子的免疫间隔上，0、1、5 月的免疫间隔安排，即考虑到了对第一次的免疫反应评估，又考虑到了两次免疫之间的休息。如果大剂量和长免疫间隔引起的免疫反应被证实，则更小的剂量和更短的免疫间隔时间的免疫效果也可以估算出。有些人使用比这里推荐的免疫间隔更短，免疫更频繁（差不多 2 周一次）。

免疫测定应该在免疫前，免疫后 2 周和 4 周进行，然后是两个月。与蛋白质免疫相反，DNA 免疫后 2 周，其体内产生的抗体很低，甚至检测不到。然而在加强免疫后 2 周，出现最强的免疫反应。对于单次注射接种或者用基因枪接种 DNA 来说，免疫后 4 周的抗体反应只有接种后 3 个月时的 10%～20%。注射接种和基因枪接种效果的不同之处在于注射接种主要倾向于增强 Th1 型免疫反应，而基因枪接种主要倾向于增强 Th2 型免疫反应。

警告：使用基因枪时必须戴好耳罩。

注意：所有使用活体动物的试验必须先上报并获得动物保护和使用联合会（IACUC）的同意，必须遵守政府关于实验室动物保护和使用的规定。

基本方案 1　小鼠注射接种 DNA

在免疫前应先阅读动物处理（附录 2C）和接种的（附录 2E）指导说明。在正式实验之前需先进行肌肉和皮下注射练习；DNA 的精准注射对于免疫成功起关键作用。可以用 India ink（或相同的染料）来定位注射的部位是否正确。

材料

>2mg 纯化的表达质粒 DNA（见实验策略和 CPI 单元 10.3）

无菌 0.9%（m/V）氯化钠

100mg/ml 盐酸氯胺酮

20mg/ml 盐酸甲苯噻嗪（xylazine. HCl）

合适品系的小鼠

0.5ml 或 1ml 的 27 号或 30 号针头的注射器

解剖刀，仅用于肌肉内接种（可选）

外科手术用钉或缝合线，仅用于肌肉内接种

小鼠固定板，仅用于皮下接种（可选）

1. 在 1.5ml 的微量离心管中用乙醇沉淀 2mg 纯化的表达质粒 DNA（单元 10.1 中基本方案部分，步骤 4～8）。用 1ml 无菌的 0.9%的氯化钠充分溶解质粒 DNA，使其终浓度为 2μg DNA/μl。4℃短暂保存或－20℃保存几周；避免反复冻融。
2. 将足量的 DNA 溶液（一般为 50μl）转移至 0.5ml 或 1ml 的带有 27 号或 30 号针头的注射器中，排去所有空气。

肌肉内接种

3a. 配制 5ml 100mg/ml 的氯胺酮和 1ml 20mg/ml 的甲苯噻嗪混合液，小鼠腹腔内注射 30～40μl 的上述混合液（或用 0.9% 氯化钠 1∶10 稀释，注射 300～400μl）麻醉小鼠。将小鼠腹部朝上平躺，在大腿内侧切开一个 1cm 长的切口，使其暴露出股四头肌肌肉。一般来说，用外科手术暴露肌肉注射的方案增加了肌肉内注射的可靠性（图 1.9.1）。

4a. 在膝盖上面 0.5cm 四头肌肌肉处以 30°角插入针头，针头斜面朝上，针头插入约 0.2cm 深。不要刺穿肌肉。当然也可选择其他的肌肉束，如胫腓骨前侧、二头肌，以及肩胛肌肉。在至少 30s 内慢慢注射 50μl DNA 盐溶液。切口用外科钉或缝线缝合。

另外一种可供选择的方案不需要麻醉小鼠，只需在距针头头部 0.1～0.2cm 制作一个颈托，这可以确保针头不会刺穿肌肉。制作这个颈托的方案是，将 100μl 枪头的尾端切下一段，然后将 30 号针头穿过枪头，枪头的宽端紧靠注射器针筒，而窄端在针头上方约 9mm 处，这样就可以保证不会刺穿肌肉，使用这一装置，就可直接注射到目标肌肉里。

皮下注射

3b. 麻醉小鼠（同步骤 3a）或用一个小鼠固定板。针头插入尾巴根部皮下约 0.2cm，针头斜面朝上，呈 5°～10°角，几乎是与皮肤平行的方向注射。慢慢注射 50μl DNA 盐溶液。由于溶液的注入，水泡随之涨大。越到后面，需要更大的推力注射。注射时手要保持不动，要避免刺穿皮肤或将针头拔出。

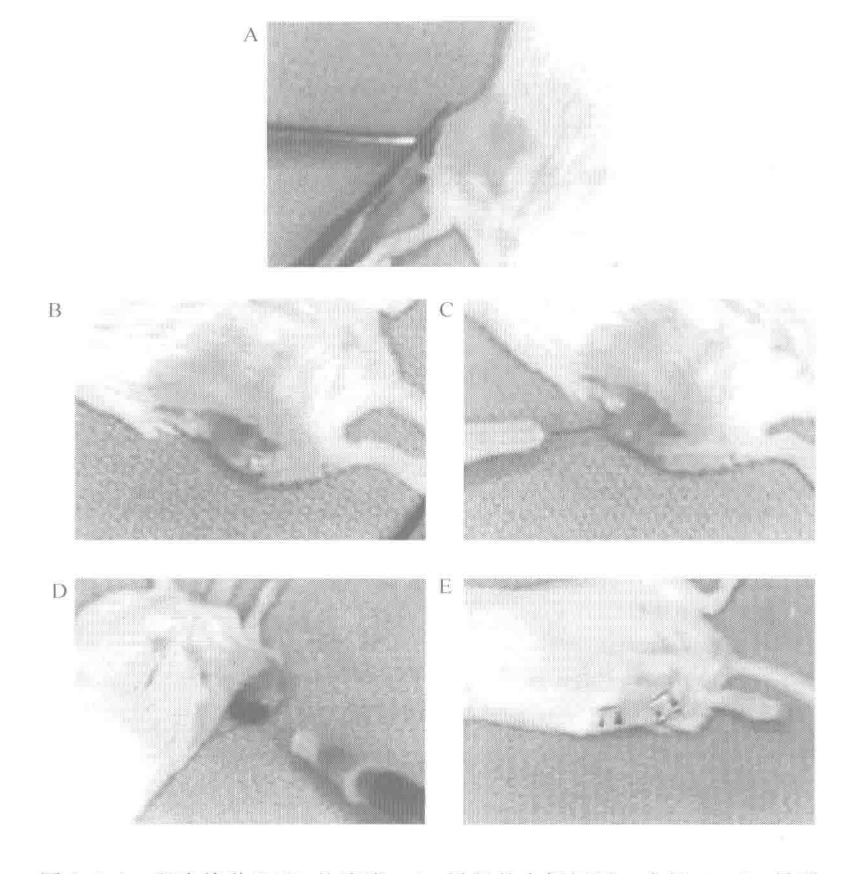


图 1.9.1　肌肉接种 DNA 盐溶液。A. 沿腿的内侧切开一个切口。B. 暴露的四头肌肌肉。C. 在四头肌肌肉前侧插入针头，0.2cm 深，在至少 30s 内注射 50μl DNA 盐溶液。由于注射溶液，肌肉应该肿胀。D. 在真正实验前应该用 India ink 或相似的染料进行试验。E. 用外科钉或缝线缝合切口。

基本方案 2　小鼠基因枪接种 DNA

材料

压缩氦气——纯度级别>4.5（99.995%）；最大压力，2600psi（1psi＝6.894 76×10^3Pa）

合适品系的小鼠

存放包裹外源 DNA 的金粉颗粒的盒子（见辅助方案 2；必须保持干燥）

基因枪和高压氦气罐调节阀，单独购买或购买 Helios 基因枪系列（Bio-Rad）

电钳

耳罩（如耳塞）

1. 将压缩氦气同调节阀和基因枪连接，根据操作手册使用基因枪。
2. 麻醉小鼠（见基本方案 1，步骤 3a；麻醉是可选的），腹部剃毛。
3. 将空弹盒装枪，开启氦气罐，戴上耳罩。将氦气压力表调至适当的压力（1μm 金粉

颗粒压力在300～500psi；见辅助方案3)。快速扳动扳机2或3次，用氦气清洁基因枪。

4. 从枪上去除空弹盒，装上包裹有外源DNA金粉颗粒的弹盒。
5. 一只手将小鼠放平（或用一只手捏住小鼠颈部，附录2C)，使刮净的皮肤暴露并伸展。将枪直接指在被刮净的腹部皮肤，与之呈90°角，扣动扳机。在目标部位中间寻找褐色斑点。将小鼠放回笼子，观察其麻醉后苏醒情况。在基因枪接种后10min内被打区域将会适度发红。

辅助方案1　包裹DNA的金粉颗粒的制备

可以参考表1.9.2，表中概括了本操作中制备颗粒所需的各种值。

表1.9.2　制备每0.5mg金粉颗粒含有1μg的DNA的枪盒所需样品的量

辅助操作步骤	测定内容	计算值
1	金粉颗粒重量	45mg
3	所需0.05mol/L亚精胺的体积	100μl
2	终浓度为2μg DNA/mg金粉颗粒时所需DNA量	90μg
	纯化的表达质粒DNA的浓度	1.0μg/μl
2	所需的纯化的表达质粒DNA的体积	90μl
4	所需1mol/L氯化钙的体积	100μl
6	终浓度为8.5mg金粉颗粒/ml乙醇[a]时所需无水乙醇的体积	5.3ml

a. Accell的基因枪要求的浓度是7mg金粉颗粒/ml乙醇。因此使用此基因枪，45mg金粉颗粒需要溶于6.4ml乙醇。

材料

1μm（或其他适当大小）金粉颗粒（Bio-Rad；Helios基因枪系统中有或单独购买)；见辅助方案3中优化方案

1μg/μl溶于水的纯化的表达质粒DNA（见实验策略和单元10.3)，请不要溶于PBS或盐溶液中

0.05mol/L亚精胺游离碱（Sigma；室温下可存放数月）

1mol/L氯化钙

新鲜无水乙醇，室温放置

聚乙烯吡咯烷酮（PVP；相对分子质量360 000；Helios基因枪系统中有或单独购买)，可选

超声水浴

15ml圆锥底聚丙烯离心管

1. 称取45mg 1μm的金粉颗粒，约可以制备75个样品管，放在1.5ml的微量离心管中。一个离心管中不要加入超过50mg的金粉颗粒。使用足够的金粉颗粒来制备2倍的实际需要量。
2. 计算需要的DNA的量和体积。每0.5mg金粉颗粒需要1μg的DNA，也就是说每1mg金粉颗粒需要2μg的DNA。所以，45mg金粉颗粒需要使用90μg或90μl的1μg/μl的纯化的表达质粒DNA。

3. 加 100μl 的 0.05mol/L 亚精胺到金粉颗粒中，将离心管放在超声水浴中约 5s。当 DNA 体积≤100μl 时加入 100μl 亚精胺。如果 DNA 的体积超过 100μl，则加入相等体积的 0.05mol/L 亚精胺，最多 400μl；体积更大的话，用乙醇沉淀质粒 DNA。
4. 加入计算好的 DNA 到金粉颗粒/亚精胺混合液中，轻轻混匀。混匀时逐滴加入 100μl 的 1mol/L 氯化钙（与亚精胺体积相等）。室温孵育约 5min，使 DNA 沉淀在金粉颗粒上。
5. 室温离心约 20s 使颗粒沉淀，弃上清。沉淀洗 3 次，每次加入约 500μl 新鲜的无水乙醇，轻轻颠倒沉淀，室温离心约 20s，再弃上清。确定颗粒不含水（如使用旧的无水乙醇），因为有水会影响颗粒在枪盒上的装载（见辅助方案 2）。
6. 计算无水乙醇的总体积，要达到每 0.5mg 金粉颗粒含 1μl DNA 的量的要求，需要在每毫升乙醇中含 8.5mg 金粉颗粒，也就是说，45mg 金粉颗粒需要使用 5.3ml 无水乙醇。
7. 将计算好的无水乙醇放在 15ml 圆锥底聚丙烯离心管中。如果有必要的话，在乙醇中加入聚乙烯吡咯烷酮（PVP，0～0.1mg/ml），作为弹盒的一种黏合剂。
8. 从上述 15ml 离心管中吸取的少量乙醇（300～500μl）来重悬 DNA/金粉颗粒。轻轻颠倒，将离心管放超声水浴 5～10s。轻轻将 DNA/金粉颗粒悬液吸至 15ml 圆锥底离心管。从离心管中将所有金粉颗粒移出，有必要的话可重复上述过程。最后将圆锥底离心管用封口膜封口，在－20℃可存放几个月。存放过程中要避免进水。

辅助方案 2　制备包裹有 DNA 的金粉颗粒的样品管

注意： 如果空气中湿度很高的话请不要制备枪筒。

材料（带√项目见附录 1）

压缩氮气——纯度等级＞4.8（99.998%）；最大压力，2600psi；氮气罐带有可调节的低压阀门，最大压力在 30～50psi（Bio-Rad）

存放在 15ml 圆锥底离心管内的 DNA/金粉颗粒/乙醇混合的颗粒悬液（辅助方案 1；如果存放在－20℃，在打开前可在室温放置一段时间）

√TE 缓冲液，pH8.0（可选）

样品管制备站（Bio-Rad 的 Helios 基因枪系统的一部分，可从 Bio-Rad 或其他供应商处单独购买），包含：

- 硅接头管（Masterflex 硅管；Cole-Parmer）
- 1/8in* Luer 接头
- 聚四氟乙烯管道（Tefzel 管，直径 1/8in，McMaster-Carr）
- 样品管切割仪（或剃刀刀片）
- 玻璃管（或同类型加帽小管）
- 干燥器

10ml 注射器

可用于 1/8in（0.32cm）管道的蠕动泵（可选）

* 1in＝2.54cm

超声水浴

分光光度计（可选）

1. 按照操作说明，将氮气罐同调节阀门和样品管制备站连在一起。同时将一段 12～13in（30.5～33cm）或更短的一段硅管通过 1/8in Luer 接头连到 10ml 注射器上。如果没有蠕动泵，准备第二个带有接头管的注射器用于去除乙醇。

   如果使用 Powderject 的样品管制备站，应使用一小段硅管（4in 或 10cm），将它同 10ml 注射器相连接，然后用封口膜封好。

2. 室温轻轻颠倒 DNA/金粉/乙醇的混合液。将装有颗粒的圆锥底离心管放在超声水浴中 5～10s 直到不存在块状金粉。

3. 用氮气清除空的聚四氟乙烯管道中的水气，时间不少于 15min，有可能的话尽量长一些。将氮气压力调至 1～2psi。通过调节管道旋转装置，将气流速度控制为 0.4～0.5L/min。

4. 剪一段与管子转头相等的干燥的管道（约 30in 或 76.2cm），将此管与 10ml 注射器相连，再次轻轻颠倒 DNA/金粉悬液，用注射器将悬液（不多于 3ml）快速地抽至聚四氟乙烯管道中。管道的两端留 2～3in（5～7.6cm）的空管子，此段空管中不要有任何液体。不要取走注射器，要防止在管道中留有气泡。

5. 确认氮气已经完全关闭，将上样管道接到管子转头上，将 DNA/金粉悬液在管道中保留 4～5min。

6. 拔去上样注射器，将蠕动泵（或者是第二个注射器）连接到样品管。以每秒 0.5～1in（1.27～2.54cm）的速率用蠕动泵（或者注射器）将乙醇去除。有一小部分金粉随乙醇一起被去除是很常见的。

   为了在 DNA/金粉/乙醇混合液中以准确的速率均匀地去除乙醇，可以在样品管上每 1in 处做标记，用计时器定时，计算速度。此过程中不要用水，因为水会污染样品管制备站。

   如果使用 Powderject 的样品管制备站，上样注射器可以留在样品管上，一旦金下沉就可以去除乙醇了。

7. 拆下蠕动泵，用管子转头以 20r/min 的转速旋转管道。转动管子 30～45s，直到金粉颗粒均匀落在管道上。

8. 通过调节阀，将氮气的流速控制在 0.35～0.4L/min，使氮气在样品管中流动，让样品管充分干燥约 4min，直至金粉从黑色（湿的）变成亮棕色（干的）。在管道末端看到一或两滴金粉是很正常的，而过多的金粉则说明管道中有水存在。

9. 停止转动管道，关上氮气，把管道从转子上取下。对着灯光观察管子中金粉分布情况，在金粉均匀分布的样品管两末端折缝或使用记号笔的方法做记号。只用有均匀涂层或绝大多数金涂层呈细金线的管道。

   如果金粉没有在管道内形成涂层，而形成一条很厚的金线，是因为乙醇去除的太慢了。如果金涂层呈漩涡或带状出现，是因为乙醇去除的太快了。如果金粉分布稀少或呈斑点状，有可能是 DNA/金粉/乙醇制备过程中污染了水，需要进一步干燥（步骤 10）。

10. 制备过程中污染水：记下制备好的 DNA/金粉/乙醇混合液体积，离心混合液，用

新鲜的无水乙醇洗涤沉淀 3～5 次。用等刻度的新鲜无水乙醇重悬颗粒。用此 DNA/金粉/乙醇（步骤 3～9）混合液制备样品管，空管子通氮气净化的时间要更长（步骤 3～9）。有必要的话，可以等天气不潮湿的时候来制备管道。

11. 用刀片把做过记号的管道切下来，扔掉不要的一段。将剩下的管子切成 0.5in (1.27cm)，最好用样品管切割仪或刀片切割管子。将管道放在有干燥剂的玻璃管中。用封口膜将盖子封口。管子可在 4℃存放 8～12 个月。
12. 可选操作：样品管中 DNA 含量的定量。将 5 个样品管放在有 500μl 的 pH8.0 的 TE 缓冲液的 1.5ml 微量离心管中，超声，直至金粉从管壁上脱落，DNA 复溶。最大转速离心约 5min。用分光光度计测上清 A_{260} 值，计算 DNA 的含量。理论上说包被时如果 100％的 DNA 都包裹在金粉颗粒上，那么每个样品管可以得到 1μg 的 DNA，相当于 A_{260} 的值为 0.2。

辅助方案 3　基因枪接种中氦气压力和颗粒大小的最优化

皮肤表皮层是基因枪接种 DNA 的理想的部位。角质层和皮肤的表皮层的厚度在不同种属是不同的。对于每一个种属，接种到表皮处的方法应该进行优化。这包括氦气压力（100～500psi）、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）的浓度（每毫升乙醇含 0～0.1mg PVP）、接种的 DNA 量（2ng～10μg）、金粉颗粒的大小（1～3μm）、接种金粉颗粒的量 (0.125～0.5mg) 及接种的部位（典型的在腹腔皮肤）。小量（0.25g）一定直径大小的颗粒可以从 Bio-Rad 购买，而大量可以从 Degussa 购买。

材料

合适品系的小鼠
装有包裹的 DNA 的金粉颗粒的枪筒（见辅助方案 2）
溶于 PBS 的 4％（m/V）的多聚甲醛（附录 1）
电动剃须刀
皮肤打孔机
切成 1in×1in（2.5cm×2.5cm）大小的标记卡片
组织切片盒
显微镜

1. 麻醉小鼠（见基本方案 1，步骤 3a），用电动剃须刀给腹部剃毛。用基因枪在压力 100～500psi 范围内，按 100psi 的增量在不同点接种包裹 DNA 的金粉颗粒（见基本方案 2）。每个条件下接种 2 次，确定在腹部皮肤上的接种位点没有重叠，点与点外圈之间的距离约为 0.5cm，每个小鼠接种四个点。
2. 用皮肤打孔机活检接种过的点，这可在接种后数分钟内进行。按皮肤的方向将活检的皮肤放在 1in×1in 的卡片上。因为打过孔的地方很快就会愈合，不需要缝合。对进行过多次活检的小鼠可以实行安乐死（附录 2G）。
3. 将卡片上的活组织放在切片盒中，用 4％的多聚甲醛固定组织。用石蜡包埋并切片 (CPI 单元 21.4)。用伊红染色，在显微镜下观察切片中颗粒的深度。

在所有的切片中，在角质层、表皮层和真皮层都可以发现颗粒。对各层中的颗

粒进行计数，可以确定在哪种条件下，在表皮层的颗粒是占总量百分比最高的（通常为40%～60%)。一般地，采用的压力变化至少在100psi才会造成颗粒接种的深度明显不同。

参考文献：Donnelly *et al*., 1997；Fynan *et al*., 1993；Robinson and Torres，1997；Tang *et al*., 1992

撰稿人：Harriet L. Robinson and Tamera M. Pertmer

[田野苹（单元1.1～1.4）　蒋应明（单元1.5～1.9)]

第二章　小鼠淋巴细胞功能的体内体外分析

免疫学家一直试图通过体外实验来分析免疫应答产生的复杂的相互作用，他们认为这种体外实验能模拟 B 细胞和 T 细胞在体内的活化过程。本章除介绍不同淋巴细胞的分离技术外，还介绍一些体外检测 B 细胞和 T 细胞功能的经典方法。

淋巴细胞及其亚群的分离

本章首先介绍从小鼠淋巴器官制备细胞悬液的基本技术，包括去除红细胞和死细胞的方法（单元 2.1）。B 细胞的富集可采用磁性分离技术，即通过交联磁珠的特异性单克隆抗体标记细胞表面抗原的方法（单元 2.2）。富集两大主要的 T 细胞亚群（即 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ 细胞）中的任何一个可以采用 autoMACS 系统，一种自动的磁性细胞分离器（单元 2.2）。类似的免疫磁性分离方法也用于分离人类淋巴细胞的不同亚群（单元 8.2 和单元 8.3）。单元 2.4 中，分离小鼠脾脏 NK 细胞采用补体介导的细胞裂解方法。去除或富集辅助细胞的方法在单元 2.11 中介绍。单元 2.3 中介绍的树突细胞（一种专职 APC）的纯化方法可以达到很好的富集效果。

使用这些技术时请注意：这里介绍的细胞分离方法并不能分离或去除具有某一特定功能的细胞群体，因为某一特定功能在不同细胞类型之间是重叠的。

B 细胞功能的研究

本章主要介绍 B 细胞功能的检测，首先是定量检测有丝分裂原或抗原处理后分泌 Ig 的 B 细胞的定量（单元 2.5）。在 T 细胞依赖的 B 细胞应答中至少需要三种细胞存在（B 细胞、辅助性 T 细胞和辅助细胞），若需采用单元 2.5 介绍的方法取得可重复的结果还需要积累一定的经验。另一种计数分泌 Ig 的 B 细胞的方法是单元 8.11 中介绍的 ELISPOT 技术，用于分析人类 B 细胞。离体培养的 B 细胞也能向上清中释放 Ig，分析该培养条件下 Ig 分泌总量可以用单元 1.1 介绍的 ELISA 法。与单元 2.5 介绍的空斑形成细胞分析相比，ELISA 技术不能对分泌 Ig 的 B 细胞进行计数。

单元 2.6 中介绍评价 B 细胞早期活化的方法（如诱导胞内钙水平升高，细胞体积增大，以及 MHCII 类抗原表达上调）。虽然这些方法很实用，但必须注意的是胞内钙水平升高或细胞体积的增加并不是 B 细胞活化的特异性指标，因为 T 细胞活化过程中也会产生胞内钙水平升高和细胞体积增加（流式细胞术还可以通过测量前向光散射分析细胞体积；单元 4.2）。

最后，单元 2.7 介绍有丝分裂原和抗 Ig 抗体诱导 B 细胞增殖的检测方法。

T 细胞功能的研究

本章除了介绍 B 细胞的分离和功能检测方法外，还介绍 T 淋巴细胞功能分析和 T

细胞发育相关研究的方法。单元 2.10 介绍细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）杀伤表达某一抗原的靶细胞的检测方法。抗原、有丝分裂原、抗 TCR 和抗 Thy-1 抗体诱导或用佛波酯十四烷酸和钙离子载体直接激发胞内信号途径引起的 T 细胞增殖，可采用单元 2.11 中介绍的方法检测。诱导增殖的方法同样可以用于建立培养体系来分析细胞因子的分泌情况，详见第五章。需要注意的是单元 2.10 和单元 2.11 中介绍的方法是用来检测某种异质细胞群体的反应，因此不能用于对在某一细胞群体中对产生应答的 T 细胞频率进行量化。即使更大范围的剂量反应曲线（单元 2.10 和单元 2.11）也只能对 T 细胞某一异质性群体的活性进行半定量评价。

经过体内抗原免疫后，该抗原反应性 T 细胞出现的频率仍较低，而且针对某种已知蛋白质或肽可出现不同类型的免疫应答。事实证明，表达单一的抗原受体的克隆化的 T 细胞系（单元 2.12）在研究与辅助性 T 细胞和细胞毒性 T 细胞活化相关的分子事件，以及分析 T 细胞抗原识别的高度特异性方面具有不可估量的价值。克隆化的 T 细胞系需要定期的抗原、辅助细胞和生长因子的重复刺激，因此并非真正意义上的永生化。另一种从克隆水平分析 T 细胞功能的方法是将活化的 T 细胞与药物标记的胸腺瘤细胞融合（单元 2.13）。T 细胞杂交瘤可在没有生长因子存在的情况下大量繁殖，事实证明它对 T 细胞受体复合物的生物化学和分子生物学水平研究具有重要价值。然而必须注意的是不要将 T 细胞克隆和杂交瘤中的研究结果普遍化，也不要将该结果外推到 T 细胞的异质性群体中。相反，应该把在 T 细胞克隆和杂交瘤中的研究最终应用到新鲜分离的 T 细胞中。

相关分离方法和功能分析

实验室常用的一些其他研究淋巴细胞发育的方法也在本章介绍。单元 2.14 介绍细胞凋亡的分析方法。尽管通过凋亡程序引起的细胞活力丧失并不仅局限于 T 细胞，但某些发育中的胸腺细胞亚群的确会发生凋亡。

尽管现代检测 T 细胞和 B 细胞功能主要依赖于本章中介绍的体外方法，但在一定的实验条件下，可以通过体内方法提供一些体外实验无法得到直接的生物意义的信息。特别是评价那些复杂的生物学现象（所有的步骤未能得到很好的理解）的检测，最好是在活体动物体内进行。

专门用于检测淋巴细胞增殖的方法在单元 2.8 中介绍。在单元 2.8 中，溴脱氧尿苷，一种胸腺嘧啶的类似物，用于体内标记 B 和 T 细胞以检测其增殖。在单元 2.9 中介绍应用稳定的胞内荧光染料 CFSE 来定量检测体内体外淋巴细胞的增殖，并监测动物体内细胞的迁移。

撰 稿 人：Ada M. Kruisbeek

单元 2.1　小鼠单个核细胞的分离

基本方案　从脾脏、胸腺和淋巴结制备细胞悬液

材料（带√项目见附录 1）

√ RPMI-5 或 DMEM-5 完全培养基
新鲜分离的小鼠器官：≤6 周龄的小鼠胸腺；6 周至 6 个月龄的小鼠脾脏和淋巴结
60mm×15mm 培养皿
剪刀和镊子（保存在 70%乙醇的烧杯中）
装有 19G 针头的 6ml 注射器
200μm 尼龙滤网

1. 将新鲜分离的器官放入盛有 3ml RPMI-5 或 DMEM-5 完全培养基的 60mm×15mm 培养皿（每种器官一个培养皿）中，用剪刀将器官剪碎。
2. 用 6ml 注射器的活塞将组织块向培养皿底面用力挤压直到仅剩纤维组织。
3. 用装有 19G 针头的 6ml 注射器将组织悬液反复抽吸数次，以进一步粉碎组织团块。
4. 将细胞悬液通过 200μm 尼龙滤网滤入离心管中。用约 4ml 完全培养基洗一次培养皿，如需要则重复一次，之后将洗液通过滤网加入离心管中。
5. 在 Sorvall H-1000B 离心机中以 1000r/min（200g）离心 10min 后弃上清（如需要去除红细胞和死细胞，见辅助方案）。用 20ml 完全培养基将沉淀重悬后离心，再以适量培养基重悬以便计数（附录 3A）。
6. 如细胞不能立即处理，最好的保持细胞活力的办法是将细胞悬液置于冰块中。这种处理也能减少因细胞贴壁引起的细胞损失（单元 2.3）。

辅助方案 1　去除脾脏细胞悬液中的红细胞

脾脏细胞悬液在进行淋巴细胞计数之前最好先去除红细胞（RBC）。胸腺和淋巴结细胞悬液则不必去除红细胞。脾脏细胞的亚群分离也需先去除红细胞。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

√ACK 裂解缓冲液

1. 每个脾脏用约 5ml 裂解缓冲液悬浮脾脏细胞；一个 12ml 试管可用于裂解一个或两个脾脏，也可以用 50ml 离心管裂解更多的脾脏。
2. 室温孵育 5min，间以摇动。
3. 加入洗液直至装满容器，在低速离心机上以 200g 离心 10min 后弃上清。再洗沉淀一次并以适量培养基重悬以便下一步操作（如去除死细胞、细胞计数或者细胞分离）。

辅助方案 2 一步梯度法去除死细胞

下面介绍的方法，其基本原理是基于活细胞（密度较小）和死细胞（密度较大）密度不同，从而有助于将活的淋巴细胞与红细胞分离。

附加材料

高密度溶液：Ficoll-Paque（Ficoll 和泛影酸钠；Pharmacia LKB）或 Lympholyte-M（Cedarlane）

12ml 或 50ml 聚丙烯离心管（比聚苯乙烯离心管好）

注：Ficoll-Paque 和 Lympholyte-M 的密度与温度有关；该方法中所采用的以及其他商品化的高密度溶液适合在室温中使用。因此应注意使细胞悬液、离心和高密度溶液控制在室温。否则会因活细胞沉入离心管底导致在密度界面上损失活细胞。

1. 用 RPMI-5 完全培养基混悬细胞，分装到离心管中使其细胞数达到 $0.5\times10^8 \sim 1\times10^8$ 个细胞/2ml（12ml 离心管）或 $1\times10^8 \sim 5\times10^8$ 个细胞/5ml（50ml 离心管）。
2. 用移液器吸取 3ml（使用 12ml 离心管时）或 5ml（使用 50ml 离心管时）高密度溶液，将枪头伸到离心管底，缓慢将高密度溶液加入细胞悬液下方。
3. 室温，800g 离心 15min。为了取得好的分离效果，最好将离心机的“brake”开关关掉。
4. 使用 5ml 移液器，沿高密度层表面缓慢移动移液器枪头，吸入漂浮在高密度层上方的活细胞，尽量少收集高密度溶液。将活细胞移入另一管中。
5. 加入 RPMI-5 完全培养基（少量细胞加入 10ml，细胞量较多时加入 40ml），室温，200g 离心 10min。重复一次。
6. 以适量培养基混悬细胞以便进行下一步操作。

撰 稿 人：Ada M. Kruisbeek

单元 2.2 磁珠法分离 T 细胞和 B 细胞

本单元介绍用磁性分离技术分离 T 细胞、B 细胞，以及 T 细胞亚群的方法。

注：使用 autoMACS 时，请参考仪器说明书进行正确的安装、使用和保养。MidiMACS 分离磁铁、MACS 支架，以及 LS 和 LD 分离柱可分别与 LS 或 LD MidiMACS 分离试剂盒打包购买（Miltenyi）。

基本方案 1 用 AUTOMACS 系统进行总 T 细胞、$CD4^+$ 细胞或 $CD8^+$ T 细胞的自动分离

材料（带√项目见附录 1）

小鼠

√HBSS 洗涤缓冲液

√MACS 缓冲液
磁珠（表 2.2.1；Miltenyi）
√RPMI-10 完全培养基
autoMACS 系统和分选柱（Miltenyi）
30μm 尼龙网（BD）或 40μm 预分离滤膜（Miltenyi）

表 2.2.1　小鼠 T 细胞群分离的磁珠选择

目的细胞	磁珠
总 T 细胞	CD90（Thy1.2）
$CD4^+$ T 细胞	CD4（L3T4）
$CD8^+$ T 细胞	CD8a（Ly-2）

1. 用 5 只小鼠的淋巴结或 2 只小鼠的脾脏制备单细胞悬液并去除红细胞（单元 2.1）。
2. 将细胞在 10ml HBSS 洗涤缓冲液中混悬后用血细胞计数器计数（附录 3A）。
3. 将细胞悬液在 4℃，200g 离心 10min。弃上清后将沉淀按每 10^8 个细胞 0.9ml MACS 缓冲液的比例混悬。每 10^8 个细胞加入 0.1ml 适当的磁珠（表 2.2.1）后在 4℃孵育 15min。
4. 在孵育的时间里，打开 autoMACS 系统电源。按产品说明书中操作规程运行清洁程序。
5. 将细胞悬液在 4℃，200g 离心 10min。弃上清，在沉淀中加入足量的 MACS 缓冲液使细胞浓度达到 10^8 个细胞/ml，充分混悬。将细胞通过 30μm 尼龙网或 40μm 预分离滤膜。用 0.1～0.4ml MACS 缓冲液冲洗滤网。
6. 将细胞放到 autoMACS 的上样通道。选择 possel 程序，这样标记的细胞将从阳性通道洗脱。
7. 将细胞悬液在 4℃，200g 离心 10min。弃上清后将沉淀用 2～5ml RPMI-10 完全培养基混悬。计数（附录 3A）。

基本方案 2　使用 AUTOMACS 系统进行 B 细胞的自动分选

材料（带√项目见附录 1）

小鼠
√HBSS 洗涤缓冲液
√MACS 缓冲液
CD45R（B220）磁珠（Miltenyi）
√RPMI-10 完全培养基
autoMACS 系统和分选柱（Miltenyi）
30μm 尼龙网（BD）或 40μm 预分离滤膜（Miltenyi）

1. 用 2 只小鼠的脾脏制备单细胞悬液并去除红细胞（单元 2.1）。
2. 将细胞在 10ml HBSS 洗涤缓冲液中混悬后用血细胞计数器计数（附录 3A）。

3. 将细胞悬液在4℃，200*g*离心10min。弃上清后将沉淀按每10^8个细胞0.9ml MACS缓冲液的比例混悬。每10^8个细胞加入0.1ml CD45R（B220）磁珠后在4℃孵育15min。
4. 按基本方案1中的步骤4～7操作，这样B细胞将从阳性通道洗脱。

基本方案3　使用AUTOMACS系统进行辅助细胞的自动分选

材料（带√项目见附录1）

小鼠
√HBSS洗涤缓冲液
√MACS缓冲液
CD90（Thy1.2）磁珠（Miltenyi）
√RPMI-10完全培养基
autoMACS系统和分选柱（Miltenyi）
30μm尼龙网（BD）或40μm预分离滤膜（Miltenyi）

1. 用2只小鼠的脾脏制备单细胞悬液并去除红细胞（单元2.1）。
2. 将细胞在10ml HBSS洗涤缓冲液中混悬后用血细胞计数器计数（附录3A）。
3. 将细胞悬液在4℃，200*g*离心10min。弃上清后将沉淀按每10^8个细胞0.9ml MACS缓冲液的比例混悬。每10^8个细胞加入0.1ml CD90（Thy1.2）磁珠后在4℃孵育15min。
4. 除了选择depletes程序（非possel程序），其他操作按基本方案1中的步骤4～7进行，这样辅助细胞将从阴性通道洗脱。

备选方案1　用磁性分选柱手工操作分离淋巴细胞

附加材料（其他材料见基本方案1，带√项目见附录1）

√不含气体的MACS缓冲液，4℃（在上样和洗柱过程中保持冰冷）
Midi MACS分离磁铁、MACS多用支架、LS或LD分选柱（Miltenyi）
15ml离心管，无菌

1a. 对于分离总T细胞，$CD4^+$ T细胞或$CD8^+$ T细胞：按前述方法制备并标记单细胞悬液（见基本方案1，1～3步）。
1b. 对于分离B细胞：按前述方法制备并标记单细胞悬液（见基本方案2，步骤1～3）。
1c. 对于分离辅助细胞：按前述方法制备并标记单细胞悬液（见基本方案3，步骤1～3）。
2. 将细胞悬液在4℃，200*g*离心10min。
3. 离心期间，将Midi MACS分离磁铁安装到MACS多用支架上，并将LS分选柱（用于分离总T细胞、$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞或B细胞）或LD柱（用于分离辅助细胞）放到磁体中，在分选柱下放一支无菌的15ml离心管。用4℃不含气体的MACS缓冲液冲洗分选柱3次，每次3ml。弃洗脱液，在分选柱下方放置一支干净的无菌离心管。

4. 离心结束后弃上清，将沉淀按 10^8 个细胞/ml 的浓度用 MACS 缓冲液彻底混悬。将细胞通过 30μm 尼龙网或 40μm 预分离滤膜。用 0.1～0.4ml MACS 缓冲液冲洗滤网。
5. 将细胞悬液上样到 LS 或 LD 分选柱上。
6. 用 MACS 缓冲液每次 3ml 冲洗分离柱 3 次。第一个 3ml 应缓慢加入以免扰动分选柱中的细胞。如果需要，将洗脱液作为阴性细胞保存（如果分离辅助细胞，阴性细胞中含有去除的 T 细胞）。
7. 从磁体上取下分选柱，放在一个干净的无菌 15ml 离心管上。在分离柱中加入 5ml MACS 缓冲液。将活塞塞进分离柱并洗脱阳性细胞，根据分选柱和标记抗体的不同分为总 T 细胞、$CD4^+$ 细胞、$CD8^+$ 细胞或 B 细胞（步骤 1）。
8. 将细胞悬液在 4℃，200*g* 离心 10min。弃上清后将沉淀用 2～5ml RPMI-10 完全培养基混悬。计数（附录 3A）。

基本方案 4　用 AUTOMACS 系统自动分选 $CD4^+CD25^+$ 抑制性细胞

由此方法得到的阴性细胞（$CD4^+CD25^-$）可用作反应细胞或对照细胞。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠
√HBSS 洗涤缓冲液
√MACS 缓冲液
CD8a（Ly-2）磁珠（Miltenyi）
√结合缓冲液
biotin-抗 CD25（7D4）（PharMingen）
Streptavidin-PE（PharMingen）
抗 PE 磁珠（Miltenyi）
完全 RPMI 培养基
小鼠 $CD3^+$ T 细胞富集柱和 1×纯化柱缓冲液（R&D Systems）
15ml 离心管，无菌
30μm 尼龙网（BD）或 40μm 预分离滤膜（Miltenyi）
autoMACS 系统和分选柱（Miltenyi）

1. 用 20 只小鼠的淋巴结制备单细胞悬液并去除红细胞（单元 2.1）。
2. 将细胞在 20ml HBSS 洗涤缓冲液中混悬后用血细胞计数器计数（附录 3A）。
3. 将细胞悬液在 4℃，200*g* 离心 10min。离心过程中，准备 3 支小鼠 $CD3^+$ T 细胞纯化柱，按说明书的指导用 1×纯化柱缓冲液洗 3 遍。弃洗脱液，在每支纯化柱下方放置一支 15ml 离心管。
4. 用 3ml 1×纯化柱缓冲液和 3ml HBSS 洗涤缓冲液混悬细胞。将细胞通过 30μm 尼龙网或 40μm 预分离滤膜后，每支纯化柱中加入 2ml 细胞。室温孵育 15min。
5. 用 2ml 1×纯化柱缓冲液洗涤纯化柱 4 或 5 遍以洗脱 T 细胞。用血细胞计数器计数（附录 3A）后，将细胞悬液在 4℃，200*g* 离心 10min。

6. 将沉淀按每10^8个细胞加0.9ml MACS缓冲液的比例混悬。每10^8个细胞加入0.1ml CD8a（Ly-2）磁珠后在4℃孵育15min。
7. 4℃，200g离心10min。
8. 以MACS缓冲液混悬细胞，使细胞浓度达到10^8个细胞/ml。将细胞通过30μm尼龙网或40μm预分离滤膜。将细胞放到autoMACS的上样通道。选择depletes程序（$CD4^+$ T细胞将从阴性通道洗脱）。
9. 回收细胞计数（附录3A），在4℃，200g离心10min。
10. 用结合缓冲液混悬细胞使其浓度达10^8个细胞/ml。每10^8个细胞加入15μg biotin-抗CD25（7D4）。4℃孵育15min。4℃，200g离心10min。
11. 用结合缓冲液混悬细胞使其浓度达10^8个细胞/ml。每10^8个细胞加入7.5μg Streptavidin-PE。4℃孵育15min。
12. 4℃，200g离心10min。
13. 用MACS缓冲液混悬细胞使其浓度达10^8个细胞/ml。每10^8个细胞加入0.1ml抗PE磁珠。4℃孵育15min。
14. 4℃，200g离心10min。

    这种三步标记方案是一种被广泛采用的方法，具有重复性好、回收细胞纯度高的特点。但是，有几种新试剂能将操作减少到两步。与抗CD25抗体孵育后，细胞可被链霉亲和素磁珠（Miltenyi）或者抗生物素磁珠（Miltenyi）标记。三步法的优势在于细胞被荧光染料标记，分离后的细胞可以直接在流式细胞仪上进行纯度分析（如单元4.2所述）。如采用链霉亲和素或抗生物素磁珠，则需要染色后才能进行FACS分析。另一种选择是将细胞用PharMingen公司生产的PE抗CD25（PC61）标记后，用抗PE磁珠处理。但是，研究人员应该知道PC61阻断IL-2与CD25的结合，而7D4克隆则不会。因此，使用PC61时应仔细计算效价并使用尽可能少的量，以免受体饱和而影响细胞功能。

15. 用MACS缓冲液混悬细胞使其浓度达10^8个细胞/ml。将细胞放到autoMACS系统的上样通道。选择posseld程序（$CD4^+$ $CD25^+$细胞将由阳性通道洗脱，$CD4^+$ $CD25^-$细胞从阴性通道洗脱）。
16. 将细胞在4℃，200g离心10min。用2ml完全RPMI培养基混悬$CD25^+$细胞。用10ml完全RPMI培养基混悬$CD25^-$细胞并用血细胞计数器计数（附录3.A）。

    为了保养仪器，autoMACS可用一个柱子，用possel _ s程序纯化细胞。纯化的$CD25^+$细胞可以在autoMACS（一次冲洗后）再次以possel程序上样。

备选方案2　用磁性分选柱手工操作分离$CD4^+CD25^+$抑制性细胞

附加材料（其他材料见基本方案4）

√不含气体的MACS缓冲液，4℃（在上样和洗柱过程中保持冰冷）
Midi MACS分离磁铁（Miltenyi）
MACS多用支架（Miltenyi）
LD分选柱（Miltenyi）

15ml 离心管，无菌

LS 分选柱（Miltenyi）

1. 按前述方法制备单细胞悬液，纯化 T 细胞并加入 CD8a（Ly-2）磁珠（见基本方案 4，步骤 1～7）。
2. 将 Midi MACS 分离磁铁安装到 MACS 多用支架上，并将 LD 分选柱放到磁体中，每次用 3ml 4℃不含气体的 MACS 缓冲液冲洗分选柱共 3 次。弃洗脱液，在分选柱下方放置一支新的无菌 15ml 离心管。
3. 离心结束后弃上清，将沉淀用 10^8 个细胞/ml 的 MACS 缓冲液彻底混悬。将细胞通过 30μm 尼龙网或 40μm 预分离滤膜。用 0.1～0.4ml MACS 缓冲液冲洗滤网。
4. 将细胞悬液上样到 LD 分选柱上。
5. 用 MACS 缓冲液冲洗分离柱每次 3ml，共 3 次。第一个 3ml 应缓慢加入以免扰动分选柱中的细胞。将洗脱液作为阴性细胞（$CD4^+$ 细胞）保存。
6. 将细胞悬液在 4℃，200*g* 离心 10min。
7. 按前述方法用结合缓冲液混悬细胞后加入 biotin-抗 CD25、Streptavidin-PE，以及抗 PE 磁珠（见基本方案 4，步骤 10～14）。
8. 用 MACS 缓冲液混悬细胞使其浓度达 10^8 个细胞/ml。
9. 将一支 LS 分选柱放在 Midi MACS 分离磁铁上，用 MACS 缓冲液每次 3ml 洗 3 遍 LS 柱。弃洗脱液，在分选柱下方放置一支新的 15ml 离心管。
10. 离心结束后弃上清，将沉淀用 MACS 缓冲液彻底混悬使细胞浓度达 10^8 个细胞/ml。
11. 将细胞通过 30μm 尼龙网或 40μm 预分离滤膜。用 0.1～0.4ml MACS 缓冲液冲洗滤网。
12. 将细胞悬液加到 LS 柱中。
13. 用 MACS 缓冲液冲洗分离柱每次 3ml，共 3 次。第一个 3ml 应缓慢加入以免扰动分选柱中的细胞。将洗脱液作为阴性细胞（$CD4^+CD25^-$ 细胞）保存。
14. 将分选柱从磁铁上取下。在分离柱中加入 5ml MACS 缓冲液。将活塞塞进分离柱并洗脱阳性细胞（$CD4^+CD25^+$ 细胞）。
15. 将细胞在 4℃，200*g* 离心 10min。将 $CD25^+$ 细胞用 1～2ml RPMI 完全培养基混悬。将 $CD25^-$ 细胞用 10ml RPMI 完全培养基混悬。计数（附录 3A）。

撰 稿 人：Angela M. Thornton

单元 2.3　树突细胞的分离

这个单元介绍两种分离树突细胞（DC）的方法：从小鼠脾脏分离 DC 和从小鼠骨髓前体细胞获得大量 DC。其他分离小鼠脾脏或者其他组织或者人的组织中 DC 的方法见表 2.3.1。需要注意的是，如果仅仅是富集广义上的 APC，则可以选用单元 2.11 中的方法。

表 2.3.1 已分离过树突细胞的组织

组织	来源	参考文献
淋巴组织		
脾脏	小鼠	Steinman *et al*., 1979; Macatonia *et al*., 1989; Vremec *et al*., 1992
淋巴结	大鼠	Klinkert *et al*., 1982
扁桃体	人	Hart and McKenzie, 1988
派氏结	小鼠	Spalding *et al*., 1983
胸腺	小鼠	Kyewski *et al*., 1986; Crowley *et al*., 1989
	大鼠	Wong *et al*., 1982
	人	Landry *et al*., 1990
	禽	Guillemot *et al*., 1984
循环系统		
血液	人	Freudenthal and Steinman, 1990
输入淋巴	大鼠	Pugh *et al*., 1983; Mayrhofer *et al*., 1986
	兔	Kelly *et al*., 1978; Knight *et al*., 1982
	绵羊	Bujdoso *et al*., 1989
	小鼠	Rhodes and Agger, 1987
非淋巴器官		
皮肤	小鼠	Schuler and Steinman, 1985
	人	Romani *et al*., 1989
肝脏	大鼠	Klinkert *et al*., 1982; Lautenschlager *et al*., 1988
渗出液	人	Zvaifler *et al*., 1985
肺脏	大鼠	Holt *et al*., 1987; Rochester *et al*., 1988
	人	Nicod *et al*., 1987
	小鼠	Pollard and Lipscomb, 1990
肠	小鼠	Pavli *et al*., 1990

基本方案 1 塑料黏附和 EA 玫瑰花结富集 DC

此种技术用于分离 DC 已经使用了很多年，其间只经过了微小的修改（Steinman *et al*., 1979）。

材料（带√项目见附录 1）

胶原酶消化的脾脏细胞悬液（见辅助方案）
√高密度牛血清白蛋白（BSA）溶液
RPMI 1640 培养基（如 Life Technologies），4℃和 37℃
√RPMI-5 完全培养基，4℃和 37℃
√抗体偶联的绵羊红细胞（EA）
用于流式细胞分析的一抗（表 2.3.2）

表 2.3.2　用来常规分析小鼠脾脏树突细胞的大鼠单克隆抗体

种类[a]	杂交瘤	抗体类型	ATCC 号	参考文献
Lymphoid DC	33D1	IgG2b	TIB227	Nussenzweig *et al.*, 1982
Thy-1.2	B5-5	IgG2b	—	Nussenzweig and Steinman, 1980
CD32 (FcrRII)	2.4G2	IgG2b	HB197	Unkeless, 1979
CD45RA (B220)	RA3-3A1/6.1	IgG2a	TIB146	Coffman and Weissman, 1981
Macrophage	SER-4	IgG2a	—	Crocker and Gordon, 1989
Macrophage	F4/80	IgG2b	HB198	Austyn, 1981
MHC-I	M1/42	IgG2a	TIB126	Springer, 1980
MHC-II (I-A/E)	M5/114	IgG2b	TIB120	Bhattacharya *et al.*, 1981
CD8	53-6.7	IgG2a	TIB105	Ledbetter and Herzenberg, 1979
Interdig. 细胞	NLDC-145	IgG2a	—	Kraal *et al.*, 1986

a. 缩写：DC，树突细胞；interdig.，指突状的。

用于流式细胞分析的二抗（荧光结合的小鼠抗大鼠 IgG 和 IgM；如 Boehringer Mannheim）

Beckman GH-3.7 和 Sorvall HS-4 转子

15ml 和 50ml 聚丙烯锥底管

填充棉花和未填充棉花的高压灭菌的 9in（约 23cm）巴氏吸管，直径 60mm 的组织培养皿（如 Falcon）

1. 将胶原酶消化的脾脏细胞悬液于 4℃，280*g* 离心 10min，弃上清。用高密度 BSA 迅速重悬沉淀物，每个脾脏约 1ml。
2. 准备 BSA 柱：将 5～6ml 细胞悬液加入 15ml 离心管中，在悬液上小心加入 4℃ 1.5ml 的 RPMI-1640 培养基，形成一明显的界面。用此种方法准备 4 或 5 个 BSA 柱，直至分完细胞悬液。
3. 将 BSA 柱于 4℃，9500*g* 离心 15min，缓慢加速，注意关掉“brake”开关。
4. 小心地用填充棉花的巴氏吸管收集分界面的细胞，吸走全部的 RPMI-1640 和顶部 1ml BSA，将细胞转移至另一干净的 50ml 离心管中（弃沉淀）。用 4℃的 RPMI-1640 充满离心管以稀释 BSA，缓慢摇动混匀。
5. 于 4℃，280*g* 离心 10min 后弃上清。重悬细胞于 5～10ml RPMI-5 完全培养基后置于冰上。
6. 台盼蓝染色计数活细胞（附录 3C，一个脾脏可得到 10^7 个低密度的脾脏细胞）。
7. 用 RPMI-5 完全培养基调整细胞密度至大约 10^7 个细胞/ml。每 4ml 悬液接种至 60mm 培养皿内直至全部细胞铺板完毕。培养 90min 使 DC 黏附。
8. 弃非黏附细胞：用填充棉花的巴氏吸管吸取 37℃ RPMI-1640 培养基，小心清洗培养皿表面，去除悬浮的细胞，直至培养皿表面由粗糙浑浊变为光滑并近乎清亮。重复洗涤一次。
9. 每个培养皿加入 4ml 37℃ RPMI-1640 培养基并培养 30～60min 以去除黏附的淋巴细胞。重复步骤 8。

10. 于倒置显微镜下利用相差观察培养皿。可见大部分深色星形树突细胞、一些明亮扁平的巨噬细胞，以及淋巴细胞、单核细胞之类的圆形细胞。如果树突细胞比例不高，则重复步骤 8、9。
11. 用 4ml 干净的 RPMI-5 完全培养基替换每个培养皿中的液体，培养 12～20h。
12. 用填充棉花的巴氏吸管吸取 37℃ RPMI-5 完全培养基洗涤平皿。将洗下来的细胞转移入置于冰上的 15ml 离心管中（每管可装 3 个平皿的洗涤细胞）。用 2mlRPMI-5 完全培养基洗涤平皿。重复该操作直到培养皿内的细胞收集完毕。
13. 将收集的细胞于 4℃，280*g* 离心 10min，弃上清。用 1ml 干净的 RPMI-5 完全培养基重悬细胞后置于冰上。
14. 台盼蓝染色计数活细胞（0.5×10^6～1.0×10^6 个细胞/脾脏，约 80%为 DC）。
15. 按每个白细胞 50 个 EA（抗体偶联的绵羊红细胞）的量加入 EA（以结合 B 细胞和巨噬细胞），颠倒混匀。4℃，70*g* 离心 10min。离心后不弃上清，直接将离心管置于冰上 30min。
16. 吸弃部分培养基，剩下 2～2.5ml。用填充棉花的巴氏吸管轻微吹打细胞悬液 10～15 次以吹散大的团块但是不破坏玫瑰花结。
17. 将重悬的细胞用血球计数器检查以确认是否每个玫瑰花结都是一个白细胞周围围绕着红细胞。如果有必要，再次悬浮细胞。
18. 制备 BSA 柱：将 5ml 高密度的 BSA 加入至 15ml 的离心管中，小心地将 2.5ml 玫瑰花结悬液加到液面上，从而形成一清晰的界面。
19. 离心并收集细胞同步骤 3～6（2×10^5～7×10^5 个细胞/脾脏，大于 95%为 DC）。
20. 用表 2.3.2 中的抗体标记 DC 用流式细胞仪检测其纯度。对于二抗，用荧光结合的小鼠抗大鼠 IgG 和 IgM。

辅助方案 胶原酶消化制备脾脏细胞悬液

用胶原酶消化的脾脏细胞悬液获得的 DC 数量是用非消化法直接磨损脾脏获得的 2～3 倍（单元 2.1）。这种方法也能够松解位于动脉周围鞘部位的 DC。

材料（带√项目见附录 1）

√4000U/ml 胶原酶 D，溶化后置于冰上
√HBSS，已灭菌，含 Ca^{2+}、Mg^{2+}（购置于 Life Technologies）
小鼠脾脏
皮下注射针，22G×1½in 内径（Becton Dickinson）
10ml、5ml 一次性注射器（如 Becton Dickinson）
100mm 直径培养皿（如 Falcon）
2 个高压灭菌的锯齿状解剖镊（如 Roboz）
高压灭菌的不锈钢网：将 40 目的不锈钢网剪成 5cm×5cm 的小方格，向下折叠边缘，然后将四边弯成浅的矩形碗；锡箔纸包裹后高压灭菌。

1. 将 2 管 1ml 的 4000U/ml 胶原酶 D 稀释（足够用于 20 个脾脏）：1ml 加入 9ml HBSS（稀释至 400U/ml，步骤 8 使用），1ml 加入 39ml 的 HBSS（稀释至 100U/ml）。置

于冰上。

2. 将 22G 针头连接在 10ml 的注射器上，充满 100U/ml 的胶原酶。将 10ml 的 100U/ml 溶液加入 100mm 的培养皿中。
3. 取另外一个直径 100mm 的培养皿进行操作。一只手拿镊子，另一只手拿注射器，拇指放在活塞上。用镊子夹住小鼠脾脏，用针头刺入脾脏被膜的狭窄边缘，注入 100U/ml 胶原酶 100μl。用镊子将脾脏推向针头，使针头前进几毫米。重复注射胶原酶，继续直到 1ml 胶原酶都注射入脾脏，针头从另一端刺穿脾脏。
4. 用针头撕开脾脏，将其转移至含胶原酶的培养皿中（步骤 2）。重复操作，直到所有脾脏都注射和撕开。
5. 从第二个培养皿中收集细胞悬液加入到置于冰上的 50ml 离心管中。用 3ml 100U/ml 的胶原酶漂洗培养皿后加到上述 50ml 离心管中。
6. 加入 3ml 100U/ml 胶原酶至培养皿中。将撕碎的脾脏依次转移至培养皿。用 2 个镊子将它们撕成边长 1mm 的小碎块，使其能通过 5ml 吸管的内径。当所有的脾脏都撕碎后，将先前放置脾脏碎块的培养皿中的胶原酶溶液加入进来，用 5ml 吸管猛烈吹打多次。
7. 倾斜培养皿，将大块碎片除开，将细胞悬液转移至第 5 步的置于冰上的 50ml 离心管中。用几毫升 100U/ml 的胶原酶洗涤培养皿后加入至离心管中。
8. 在培养皿留下的脾脏碎块中加入 10ml 400U/ml 的胶原酶。吹打数次后于培养箱里放置 30～90min。
9. 在孵育的最后阶段，猛烈吹打碎片，将其吸至直径 100mm 培养皿的无菌钢网上。
10. 用镊子固定钢网一端，用几毫升 100U/ml 胶原酶洗涤碎块，然后用无菌的 5ml 注射器活塞碾磨碎块。捣烂直到所有的红色物质从组织中去除。再用几毫升 100U/ml 胶原酶洗涤钢网。
11. 将钢网从培养皿中拿开，丢弃无色的黏附的被膜碎块。猛烈的吹打培养皿中的液体，将其转移至步骤 7 的 50ml 离心管里。用几毫升 100U/ml 胶原酶洗涤培养皿后一同加入到离心管中（约有 0.5%为树突细胞或者更少）。
12. 如果需要，即可用高密度的 BSA 离心（见基本方案 1）。

基本方案 2　用小鼠骨髓前体细胞培养树突细胞（DC）

此方法（Inaba *et al.*，1992）克服了组织中可利用的“内源性 APC”数量的有限性。一旦培养成功，大量的 DC 可用作细胞生物学的研究、遗传性状修饰、体内免疫。此种方法在研究 DC 分化的生物学中也非常重要。

材料（带√项目见附录 1）

6～7 周龄小鼠（最好为雄性鼠，因为它们的骨头比较粗大；运输后需要休息至少 5 天；不要使用应激或脱水的老鼠）

70%乙醇

冰冷的以及室温的 RPMI-1640 培养基（如 Life Technologies）

氯化铵溶液 0.02mol/L Tris · Cl，pH7.2（附录 1）/0.14mol/L NH_4Cl

裂解淋巴细胞的抗体（杂交瘤上清）（可选）。例如，杂交瘤 RA3-3A1（B220 抗体；ATCC 号 TIB146）、GK1.5（CD4 抗体；ATCC 号 TIB 207）、3.155（CD8 抗体；ATCC 号 TIB211）、M5/114（MHCII 抗体；ATCC 号 TIB120）——见单元 1.3

兔补体（Pel-Freez）

√RPMI-5 完全培养基

小鼠GM-CSF（mGM-CSF）：可以来源于纯化的重组蛋白，也可来源于转染小鼠 *GM-CSF* 基因的细胞系的条件培养基（瑞士巴塞尔 A. Lanzavecchia 博士赠送）

用于流式细胞检测 DC 的抗体：如 MHCII 类分子的杂交瘤上清（ATCC 号 TIB120）、B7-2/CD86 的杂交瘤上清（Pharmingen）、DEC-205 的抗体（ATCC 号 HB290）

解剖用品

无菌纱布垫

100mm 培养皿（如 Falcon）

3ml 注射器 25G，5/8in（1.58cm）针头

9in（23cm）巴氏吸管（填充棉花并高压灭菌）

Nytex 滤器（3-40/26；Tetko）

15ml 和 50ml 聚丙烯锥底管

24 孔培养板（如 Corning）

1. 取小鼠股骨和胫骨，保存在置于冰上的 RPMI-1640 培养基中，直到所有的小鼠准备完毕。去除骨头上的肌肉（通常在无菌纱布垫上操作）后，将干净的骨头置于新的平皿里。然后在含 70%乙醇的培养皿里浸泡骨头 2min，最后用冷 RPMI-1640 培养基洗涤 2 遍。
2. 用剪刀减去骨的两端（骺）然后将其转移到另外的培养皿中。用注射器吸取 2ml RPMI-1640 培养基冲洗骨髓腔以获得骨髓。在另一培养皿里剁碎骨骺。将剁碎的骨骺以及从骨髓腔里冲洗出来的骨髓混合在一起，用吸管打碎团块，将悬液通过筛网（去除颗粒）后收于 15ml 或者 50ml 的离心管里。
3. 加入 3～10ml 的氯化铵溶液裂解红细胞。室温静置 3min 后，室温，280*g* 离心 10min（1200r/min Beckman GH-3.7 转子），弃上清。
4. 去除淋巴细胞（可选）：将细胞配成 1×10^{7} 个细胞/ml，加入合适浓度的杂交瘤上清（通常 1∶20 终浓度）和兔补体（通常 1∶17～1∶20 终浓度）。37℃水浴培养 1h，每 20min 振荡一次。

   作者用了 B220 抗体（杂交瘤 RA3-3A1）、CD4 抗体（杂交瘤 GK1.5）、CD8 抗体（杂交瘤 3.155）和 MHCII 抗体（杂交瘤 M5/114）。

5. 用 RPMI-1640 洗涤骨髓细胞 2 次，室温，280*g* 离心 10min。计数活细胞（附录 3C）。用 RPMI-5 完全培养基调整细胞浓度至 1×10^{6} 个细胞/ml 。
6. 加入小鼠重组 GM-CSF 至终浓度为 700～1000U/ml 或者 20ng/ml。将细胞悬液一般每只小鼠可以得到 4×10^{7}～5×10^{7} 个骨髓细胞（没有去除淋巴细胞）按 1ml/孔接种

24 孔板。

7. 每两天洗涤细胞一次，每次移出旧的培养基，然后倾斜 24 孔板用 RPMI-1640 轻轻地沿孔壁洗涤细胞后吸出洗涤液，最后加入 1ml 新的含 700～1000U/ml（约 20ng/ml）mGM-CSF 的 RPMI-5 完全培养基（步骤 6）。
8. 可选：验证聚集物的特征——MHC II 类分子存在于不成熟 DC 的胞内小室（MHC II 小室或者 MIIC）通过标记 [^{3}H] 胸腺嘧啶，可发现 10%～20%的细胞处于 S 期，用流式细胞仪（单元 4.1 和单元 4.2）分析，细胞中度表达膜 MHC II 类分子，但是不表达 B7-2/CD86 共刺激分子。

　　到第 6 天，培养板孔中布满很多聚集体或者球形的处于增殖期的非成熟 DC。

9. 在第 5～8 天期间（此时已产生足够的聚集体），用 RPMI-1640 或 RPMI-5 培养基轻轻吹打，将聚集体从贴壁的基质细胞上脱离下来（此后几天一直会有聚集体产生）。收集脱离的细胞，室温，280*g* 离心 10min，弃上清。用 RPMI-5 培养基重悬，最高浓度为 1×10^6 个细胞/ml。然后铺在直径为 100mm 的培养皿中，每个培养皿 10ml，最多铺 1×10^7 个细胞。
10. 于细胞转移后 24～48h 期间，每 24h 轻轻摇晃培养皿，收集非贴壁、非增殖、成熟的 DC，转移至另外的收集管中用于后期的研究。
11. 计数活细胞（附录 3C）。用流式细胞仪（单元 4.1 和单元 4.2）或者用血球计数板（附录 3C）计数大的形状不规则的细胞来检测 DC 得率（每只动物通常获得 5×10^6～10×10^6 个细胞，≥60%表达成熟 DC 的表面标志）。

参考文献：Banchereau and Steinman，1998；Crowley *et al.*，1989；Romani *et al.*，1996

撰 稿 人：Kayo Inaba，William J. Swiggard，Ralph M. Steinman，NIkolaus Romani and Gerold Schuler

单元 2.4　从小鼠脾脏分离小鼠天然杀伤细胞

基本方案

　　由于所用 MAb 只能检测 C57BL 背景小鼠体内的 NK1.1$^+$CD3$^-$ NK 细胞，故本方案适用于 C57BL/6 或者 C57BL/10（以及 H2^{b,d,q}同系小鼠）小鼠脾脏细胞。

　　清除杂细胞所用的单克隆抗体的活性对本方案至关重要。单克隆抗体可以买到，并且其杂交瘤可以从 ATCC 得到，因此建议检测单克隆抗体的活性以保证实验成功。最佳补体和细胞浓度也需要通过实验确定。

材料（带√项目见附录 1）

　C57BL/6 或者 C57BL/10 小鼠
√Tris/NH_4Cl 裂解缓冲液
√HBSS/3%（*V/V*）FBS
　10×单克隆抗体储存液

GK1.5（ATCC 号 TIB207）、53-6.72（TIB105）、M5/114.15.2（TIB120）、J11d.2（TIB183；PharMingen；单克隆抗体配方见附录 1）

单克隆抗体 MAR18.5（TIB216；PharMingen）浓度 1mg/ml（单克隆抗体配方见附录 1）

√含酚红的 HBSS（Life Technologies）/10%（*V/V*）FBS

√低 Tox-M 兔补体，无菌复溶

淋巴细胞 M 密度梯度分离液（Accurate Chemical and Scientific），室温

√RPMI-10 完全培养基

FITC 标记的抗 CD3 抗体和 PE 标记的 PK136 抗体（Pharmingen）

50ml 和 15ml 带盖聚丙烯锥底离心管

Beckman CS-6R 离心机（或同类离心机）

血清学吸管

注：如果细胞用于继续培养，所有试剂和材料必须保证无菌。

1. 处死小鼠，无菌取脾脏。
2. 制备脾脏细胞悬液（单元 2.1），置于 50ml 离心管中，避免将纤维性杂质移入离心管。200*g* 离心 5min 以洗涤细胞。采用单元 2.1 的方法裂解红细胞，或使用 Tris/NH_4Cl 裂解缓冲液。每个脾脏的细胞用 1ml HBSS/3%FBS 混悬。
3. 用台盼蓝拒染法计数活细胞（附录 3C）。用 HBSS/3%FBS 混悬细胞至 5×10^7 个细胞/ml。置于冰上保存。
4. 制备下述单克隆抗体的 10×混合溶液（10×每种抗体的饱和浓度）：

   GK1.5（抗 CD4）

   35-6.72（抗 CD8）

   M5/114.15.2（抗 I-A 和 $I-E^{d,k}$）

   J11d.2（抗 CD24）
5. 每 0.9ml 细胞悬液加入 0.1ml 单克隆抗体混合液，4℃孵育 30min。
6. 用冰的 HBSS/3%FBS 洗细胞 2 遍，4℃，200*g* 离心 5min，弃上清。用 10ml 冰的 HBSS/3%FBS 混悬细胞再洗一遍。将细胞用 HBSS/10%FBS 混悬至浓度为 5×10^7 个细胞/ml。
7. 加入 10μg/ml 抗大鼠 κ（MAR18.5；1mg/ml 储存液）和低 Tox-M 兔补体至细胞悬液使其达到最佳终浓度（通常 1∶6，但需要根据经验确定）。37℃孵育 45min，每 15min 振摇一次。
8. 用 HBSS/10%FBS 洗一遍（步骤 6）。
9. 用 5ml HBSS/10%FBS 混悬细胞。取少量细胞悬液采用台盼蓝拒染法计数活细胞（附录 3C），以确定补体裂解效果。
10. 将 5ml 室温的淋巴细胞 M 密度梯度分离液加入到一个 15ml 离心管中。将 5ml 细胞悬液轻轻加在分离液上。室温，200*g* 离心 20min，使离心速度缓慢下降。
11. 用吸管从界面小心吸取液体，放入另一个 15ml 离心管中。必要时可将界面放在白色背景前以便看清。用 RPMI-10 完全培养基洗 2 遍（方法同步骤 6）。台盼蓝染色计数活细胞，备用。

12. 为检验细胞纯度，可加入终浓度为 10μg/ml 的抗 CD3-FITC 和 PK136-PE（抗 NK1.1）抗体，进行流式分析（第四章）。

参考文献：Ravnick *et al*.，1988；Trinchieri，1989

撰 稿 人：Amy Reichlin，Koho Lizuka，Wayne M. Yokoyama

单元 2.5　B 细胞功能的检测

注意：除非特别说明，所有培养孵育应该在含 5% CO_2 的饱和湿度的 37℃培养箱中进行。温度控制及 CO_2 浓度（5%）的维持非常关键。如果使用带自动 CO_2 感受器的培养箱，建议使用 Fyrite 气体分析仪（Bachrach Instrument）以校准 CO_2 水平。用一盘消毒过的或添加消毒剂（如硫酸铜）的水保持培养箱的湿度，注意每周更换。如果培养板外部孔有蒸发现象，注意湿度。接触细胞的所有溶液和设备都必须无菌，并相应采用无菌操作技术，大部分操作应在一个带空气层流的超净台中进行。

注意：通过体外免疫程序获得一致的结果需要健康的小鼠、无内毒素的试剂和在其他实验室或者至少体内证明有效的抗原。某些品系的小鼠可能对某些 T 细胞依赖的抗原反应性较好。F_1 代杂交小鼠来源的细胞体外反应性较好。对 T 细胞依赖的反应，T 细胞克隆可以取代来源于抗原冲击过的或 TCR 转基因的小鼠的 T 细胞。该克隆的 Th1 或 Th2 类型可能影响抗体的亚型。

注意：为优化条件，抗原必须在一个大的浓度范围内进行测试，抗体的反应在第 3、4 和 5 天要通过 PFC 检测，在第 5、7 和 9 天要进行 ELISA 检测。

基本方案 1　抗原特异性的抗体产生

在组织培养中，来源于未经过免疫动物的初始 B 淋巴细胞可以被特异抗原激活而成为抗体分泌细胞。这被认为是初次应答而且依赖于免疫系统中的其他细胞，如树突细胞、巨噬细胞、T 淋巴细胞或细胞因子。经过免疫的动物的淋巴细胞可以用于体外刺激，这种免疫应答反应更快且强度增加。

战略计划

表 2.5.1 中显示的抗原可以用于未免疫的脾脏细胞或者在活化 T 细胞或细胞因子存在的条件下纯化的 B 细胞产生抗体反应，具体描述如下。

绵羊红细胞（SRBC）

SRBC 是 T 细胞依赖的颗粒性抗原，不需要抗原致敏的或者转基因 T 细胞。这种颗粒抗原的多个表位可以激活足量的 T 细胞从而诱导全脾细胞培养中 B 细胞的活化。在淋巴细胞因子（IL-2、IL-4 和 IL-5）存在的条件下，纯化的 B 细胞也可以对 SRBC 产生反应。大多数批次的 SRBC 在体外都很有效。SRBC 可以从 Colorado Serum 购得。

表 2.5.1　体外产生抗体所需要的细胞和细胞因子[a]

抗原	T 细胞	B 细胞	巨噬细胞	细胞因子	PFC/培养基
TNP-LPS，TNP-B	−	+	+	—	500
TNP-LPS，TNP-BA	−	+	−	IL-1、IL-6、IL-5、IL-10	600
TNP-Ficoll	−	+	+	—	300
TNP-Ficol	−	+	−	IL-1、IL-6、IL-5、IL-10	400
SRBC	+	+	+		800
SRBC	−	+	+	IL-2、IL-4、IL-5 或者来源于活化 T 细胞的上清	400
TNP-OVA	预激或转染 OVA 特异 TCR	+	+	—	300

a. 简写：BA，布鲁氏杆菌；SRBC，绵羊红细胞；OVA，卵白蛋白；LPS：脂多糖。

TNP-BA 或者 TNP-LPS

三硝基苯基家族和布鲁氏杆菌（*Brucella abortus*，BA）或脂多糖（LPS）相偶联是典型的 I 型胸腺非依赖性抗原，最佳剂量时有很强的多克隆成分。和各种类型脂多糖（LPS）偶联的三硝基苯基（TNP）可以从 Sigma-Aldrich 购得。除了结合 B 细胞受体（BCR）外，TNP-LPS 可能也通过 toll 样受体 4（TLR4）向 B 细胞传递信号。LPS 的纯度非常重要，因为核酸污染严重的制品可能通过 TLR4 以及 TLR9 激活 B 细胞，而不含核酸的制品只能通过 TLR4 受体活化细胞。TNP-BA 可通过如下的方法使 TNP 结合至布鲁氏杆菌来制取。固定的 BA 有机体从美国农业部获取（国立兽医服务研究所）。这两种抗原都可以激发多种品系的小鼠的脾脏细胞发生 PFC 反应，包括 CBA/N 小鼠。TNP-LPS 对 TLR4 受体突变的 C3H/HeJ 或者 B10. CR 小鼠的脾脏细胞不产生反应。

TNP-BA

为制备这种试剂，用盐洗涤 BA 有机物，用带有 SS-34 的转子的 Sorvall RC2B 离心机（或者带 JA-12 转子的 Beckman Avanti J-25 离心机）4℃，10 000r/min 离心 5min。用 pH9. 5 的 0. 2mol/L 碳酸氢钠缓冲液（附录 1）重悬至原始体积。每毫升体积 BA 悬液加入 35mg 三硝基苯磺酸（TNBS）并轻微摇荡。在摇床里室温培养 4h 或者 4℃过夜。用盐溶液洗 3 遍后重悬至原来体积。TNP-BA 是 I 型胸腺非依赖性抗原，如表 2. 5. 1 所述，它可以在缺失巨噬细胞只含有细胞因子的条件下活化 B 细胞。

TNP-Ficoll

TNP-Ficoll 是一种 II 型胸腺非依赖性抗原，需要纯化的 B 细胞在巨噬细胞或者细胞因子（IL-1、IL-6、IL-5）存在的条件下产生最佳反应。可从 BioSearch 购买或者根据 Inman 的方法制备（1975）。三硝基和氨乙基羧甲基（AECM）衍生的 Ficoll 偶联所以命名为 TMP-AECM-Ficoll，通常缩写成 TNP-Ficoll。TNP-Ficoll 可以诱导除 CBA/N 小鼠的大多数品系小鼠的 PFC 反应，因为 CBA/N 小鼠含有一个突变的 Bruton 酪氨酸激酶。在新生鼠也没有效。

TNP-OVA

TNP-卵白蛋白（TNP-OVA）是可溶性的 T 细胞依赖的抗原，不能诱导未免疫的小鼠的脾脏细胞或者纯化的 B 细胞加细胞因子的 PFC 反应。对卵白蛋白的 323～329 段肽链特异的 T 细胞受体的转基因小鼠（DO. 11. 10 TCR 转基因小鼠）的未免疫脾脏细胞在体外能对这种抗原起反应。另外，用卵白蛋白和佐剂（单元 1. 3）致敏过的小鼠脾脏细胞可以在体外对 TNP-OVA 起反应。这种抗原可以用 TNBS 和卵白蛋白制备（见辅助方案 5）。

材料（带√项目见附录 1）

年轻的无病原体的成年小鼠

√IF12 完全培养基或者 RPMI 培养基（见配方）

无菌抗原：

1～10μg/ml TNP-LPS（Sigma-Aldrich）

TNP-BA（同上）

1～20ng/ml TNP-Ficoll（BioSearch Technologies；TNP-AECM Ficoll）

荚膜肺炎球菌多糖：Pneumo Vax（Merck）或者 Pnu-Imune（Lederle）疫苗或者纯化的肺炎球菌多糖（ATCC 号 169-X）

1～20μg/ml TNP-OVA（见辅助方案 5）

0. 01%～1% *V/V* SRBC（Colorado Serum）

√HBSS 或生理盐水（可选）

带有防蒸发盖的 96 孔 Costar 平底微量滴定板

48 孔平底板（Corning）

带微量培养板套桶的冷冻低速离心机

1. 根据需要制备脾脏或者淋巴结细胞，或者纯化的初始（单元 2. 2）或抗原刺激的 B 细胞（3～4 周前用抗原或半抗原：载体免疫过的小鼠）、T 细胞（Murphy *et al.*, 1990）和巨噬细胞（单元 6. 1），并将其悬浮在 IF12 完全培养基或者 RPMI 培养基中。计数（如使用血细胞计数器，附录 3A）。

   从载体致敏的小鼠或特异性 T 细胞受体转基因小鼠获得的 T 细胞用于体外刺激。DO11. 10T 细胞受体转基因小鼠可用于对 TNP-OVA 的反应，因为它们的 T 细胞受体能特异性识别卵白蛋白多肽（Murphy *et al.*, 1990）。活化的 B 细胞将产生更高背景的应答。产生良好的反应需要巨噬细胞或树突细胞的存在。对于 T 细胞依赖的反应，T 细胞克隆可以取代来源于抗原冲击过的或 TCR 转基因的小鼠的 T 细胞。该克隆的 Th1 或 Th2 类型可能影响抗体的亚型。

2a. 对于带防蒸发盖的 96 孔 Costar 平底板：调整细胞浓度至 100μl 培养基含 10^5～10^6 个细胞。

2b. 对于 48 孔 Costar 平底板：调整细胞浓度至 500μl 培养基含 0.5×10^6～2×10^6 细胞。

3. 准备抗原稀释液的时候将细胞置于冰上，然后加入板中。当应用多克隆反应或者使

用 TI-1 抗原的时候使用较低的细胞密度，当使用 TNP-Ficoll、SRBC，其他 T 细胞依赖抗原的情况下使用较高的细胞密度。

使用纯化的 B 细胞时，T 细胞可以按照 T 细胞/B 细胞为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 的比例滴定。如果需要，T 细胞可以用抗原或者抗 CD3 抗体预先活化。巨噬细胞按照巨噬细胞/B 细胞为 0.1、0.2、0.5 和 1.0 的比例滴定。太多的 T 细胞或者巨噬细胞能抑制 B 细胞的活化。如果没加 T 细胞或者巨噬细胞，可以向胸腺非依赖性抗原活化的 B 细胞加入细胞因子 IL-4 和 IL-5 联合，或者 IL-1 和 IL-6。在加入 IL-4 和 IL-5 时，可以联合加入 IL-2 也可以不加入 IL-2。IL-1、IL-2、IL-4、IL-5 和 IL-6 可以购于 R&D 公司。另外，少量 IL-1 和 IL-2 可以从 NIH Biological Response Modifiers Program 获得。IL-10 可以由 Schering Plough 购得。

用于培养的活细胞的比例要介于 90%～95%，以获得较好的反应（附录 3C）。

4. 在纯化 B 细胞的时候，根据实验设计，在超净台中制备无防腐剂的抗原，并将其稀释至加入每孔后终浓度符合以下要求，96 孔板每孔加入 50～100μl（终培养体积为每孔 200μl），48 孔板每孔加入 250～500μl（终培养体积为每孔 1.0ml）：

   1～10μg/ml TNP-LPS
   1∶100 TNP-BA
   1～20ng/ml TNP-Ficoll
   0.05～5ng/ml 荚膜肺炎球菌多糖
   1～20μg/ml TNP-OVA
   0.01%～1%（*V/V*）SRBC
   0.1～10μg/ml 含 CPG 基序的寡核苷酸（多克隆活化）

   每孔不能加入多种抗原。

5a. 对于 96 孔板：加入 100μl 细胞稀释液（步骤 3）至内孔中。用培养基、HBSS 或者生理盐水充满外孔。

5b. 对于 48 孔板：加入 500μl 细胞稀释液（步骤 3）至需要测定的孔中。

6. 培养 4～5d。当进行 PFC 检测时（见基本方案 2），省略下面的 2 个步骤，并在收获细胞之前建立好所有的测定条件。如果用于 ELISA 测定（单元 1.2），则进行下面所有的步骤。

7. 如果做 ELISA 测定，测定 2d 前用 200μl 完全培养基洗涤细胞去除可溶性抗原。在微量培养板离心机里 4℃，170*g* 离心 5～10min 以收集细胞。之后颠倒平板，抖动手腕甩去上清。在灭菌纱布上轻拍。如果用来刺激反应的抗原不干扰 ELISA 检测，则可跳过步骤 8 和 9，从培养体系中收集上清。

8. 向 96 孔板内每孔加入完全培养基 200μl 或者 48 孔板内每孔加入 500μl。按照步骤 7 离心弃上清。重复该步骤 2 遍。

9a. 对于 96 孔板：用 200μl 培养基重悬细胞后培养 24～48h。收集 150μl 上清并保持冷冻状态直到测定。

9b. 对于 48 孔板：用 500μl 培养基重悬细胞后培养 24～48h。收集 400μl 上清并保持冷冻状态直到测定。

10. 按照步骤 7 和 8 洗涤细胞，去除上清之后，在吸水纸上轻轻拍去残余上清。加入

200μl 完全培养基重悬细胞（两种板）。在测定前将细胞置于冰上。

空斑形成细胞测定

PFC 测定依赖补体存在的情况下 IgM 可以有效的溶解抗原包被的 SRBC。通过加入合适的特异的同型兔抗体（见备选方案 1），Jerne-Nordin 测定法（见基本方案 2）可以采用来检测其他类型的免疫球蛋白。也可以用蛋白质 A 而非抗原偶联上 SRBC 来检测多克隆 B 细胞的活化（见备选方案 2）。该测定主要的限制是一个人不能在一天处理 3 块以上的 96 孔板。这个技术需要制备特殊的托盘以固定玻片，该托盘可以重复使用多年（附录 1）。Cunningham-Szenberg 测定法（见基本方案 3）不能被轻易改良用以检测其他类型的抗体或多克隆活化，但是可以在一天之内处理多达 6～8 块 96 孔板。它需要组装不能重复利用的玻片小室并且补体需要和 SRBC 预先作用。

每一种测定法都可以检测出由通过抗原活化 B 细胞生成的单个抗体分泌细胞的抗体的产生（见基本方案 1）。当用基本方案 2 或 3 检测的时候，抗体分泌细胞（AFC 为抗体形成细胞）被称为空斑形成细胞（PFC）。当用 ELISPOT 测定法（单元 8.11）检测抗体分泌细胞时使用 AFC 这一术语。当 B 细胞和 SRBC 被铺在琼脂或琼脂糖（Jerne-Nordin 测定法；见基本方案 2）的同一单层上并用补体处理时，PFC 因其具有分泌 IgM 从而溶解围绕在 AFC 周围的抗原包被的绵羊红细胞的能力而被检测到。封闭在两张玻片之间由 B 细胞、SRBC、补体组成的薄膜上也可以观察到相似的 AFC 周围被清除的现象（Cunningham-Szenberg 测定法；见基本方案 3）。

PFC 是当 B 细胞在合适的抗原激活后变成浆细胞的一种测量方法。这是一个非常敏感和特异的方法，因为在百万个甚至更多的淋巴细胞中由几百个初始 B 细胞中生成的 AFC 可以被高度准确和特异地检测出来。在单元 8.11 里介绍的 ELSPOT 测定法是这一方法的改良，它也用来测量细胞因子分泌的 Th1 或者 Th2 细胞（单元 5.11）。

当进行 PFC 检测时，无抗原的细胞组应该产生很低（如 5～30 PFC/10^6 细胞）的反应。如果背景反应很高，那么可能是因为 B 细胞中含有预先活化的细胞或者培养基中污染了内毒素。在 Percoll 梯度分离液上离心 B 细胞并收集沉淀在 70%Percoll 界面的静息细胞可以去除预先活化的细胞。使用玻璃蒸馏过的水来配置所有的试剂、缓冲液和培养基，并提前筛选能够支持已知抗原产生很好的应答且背景很低的 FBS，这样就可以将内毒素污染降至最低。

仔细选择 FBS 对于获得好的体外抗体反应非常重要。只有筛选了很多来源的血清后才能找到一个好的批次。因此建议只筛选那些供应商可以大量提供 FBS 的批次（20～30L）。因为一个好的批次可以在−70℃保存很多年。内毒素含量低且确定的血清可以产生较低的背景反应，现在可以通过商业途径获得。

基本方案 2　Jerne-Nordin PFC 测定法

材料（带√项目见附录 1）

2×RPMI 1640 培养基中含碳酸氢盐（Invitrogen）

SeaPlaque 低熔点琼脂糖（FMC BioProducts）

TNP-SRBC（见辅助方案 3）
豚鼠补体（Colorado Serum）
√DPBS
0.85%（m/V）NaCl（如生理盐水）
43℃水浴
12mm×75mm 硼硅玻璃管（Fisher）
琼脂糖包被的玻片（见辅助方案 1）
纱布
√玻片托盘，自制（图 2.5.1）

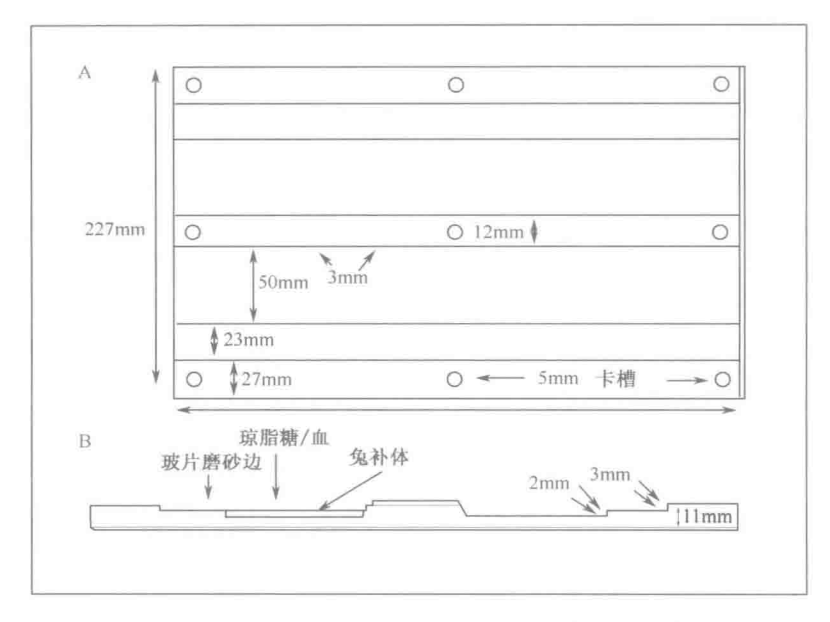


图 2.5.1　A. 玻片托盘上面观。B. 玻片托盘侧面观。

台布
玻片架和玻璃染色缸
间接光源的低倍（10×）双目解剖显微镜

注意： 在 PFC 测定开始前，玻片要预先用 0.15%琼脂糖包被，当使用半抗原偶联的 TI 或 TD 抗原时 SRBC 需和相应的抗原偶联（见辅助方案）。

1. 在 43℃水浴中预热 100ml 2×RPMI 1640。准备 1.6%（m/V）低熔点的 SeaPlaque 琼脂糖溶液（见辅助方案 1，步骤 2、3）。加入等体积的预热 2×RPMI 使得溶液变成 0.8%。摇晃烧瓶充分混合后保存于 43℃水浴中。
2. 排列 12mm×75mm 硼硅玻璃管于水浴中，和组织培养板中的顺序相同，确保每孔有一个管对应。
3. 从玻片盒中取出琼脂糖包被的玻片，一次排列 5～10 个，编号。
4. 水浴中的每管加入 400μl 琼脂糖/RPMI 溶液（步骤 1）。可使用连续移液器或者可以吸出 2.0～5.0ml 的溶液的 Cornwall 注射器加速该步骤。

5. 一次分配 50μl TNP-SRBC 到 6～8 管中。检测 1 或 2 张玻片，将混合物倒在玻片上并沿管子边缘扩散开（玻片是橙红色）。
6. 从洗涤过的培养板中的第一孔转移 100μl 细胞出来（如果用多克隆刺激剂可用小点的体积，如 20～50μl；如果诱导剂很弱可以用大点的体积，如 120μl），吹打孔底多次使得所有的细胞都转移到含琼脂糖的第一管中。
7. 将水浴中的玻璃管拿出，紧握住玻璃管防止溅出内容物，用有 2 片纱布的橡皮垫的混和器混旋。颠倒玻璃管将混合物倒入第一张玻片。迅速通过玻璃管管口扩散琼脂糖于玻璃表面上。
8. 重复步骤 6 和 7 处理完 10 个管子；在玻片干之前不能移动，也不能使它们表面向上太长时间否则会干掉。在第一批 5～10 个玻片做好之后，将它们上面朝下放在自制的玻片盒上。
9. 剩余的玻璃管和玻片重复步骤 5～8 直到所有的培养物都从管内转移到玻片上。
10. 将玻片盒（或玻片架和染色缸）重叠起来，将另外一个玻片盒放在上面，用湿布和大塑料袋盖上（后者可选）。
11. 在无 CO_2 的 37℃环境下培养 1h。
12. 用 DPBS 稀释豚鼠补体（通常每个玻片盒需要 48ml 1：20 或 1：25 稀释的补体），温和混匀（不要剧烈振荡），维持在 37℃的环境下。
13. 从玻片盒外去除湿布。用 10ml 或 20ml 移液管将稀释的补体从玻片的一端淹没玻片，移液管头要接近玻片的边缘，确保在玻片下没有气泡。
14. 在无 CO_2 的 37℃环境下培养 1h。
15. 将玻片轻轻放在玻片架上，然后将玻片架浸泡在含有 0.85%（*m/V*）的氯化钠的染色缸中。
16. 立即观察玻片或在 4℃保存几个小时后观察。并在低倍双目解剖显微镜（放大 10 倍）下用间接光照亮琼脂糖层计数空斑数目。空斑在琼脂糖的 SRBC 层里显现成色圈样。如果在空斑处看到了颗粒，那么认为这是个假空斑。

基本方案 3　Cunningham-Szenberg PFC 测定法

适当的吸收豚鼠补体对这项检测很重要。并且，补体溶化后应该立即使用，不要再次冻存。所有的试剂应于室温时使用以避免在小室中形成气泡。玻片小室应该在灌满之后的 20min 内用蜡封起来以避免干燥。

材料（带√项目见附录 1）

蜡（组织制备级）
√含添加物的 RPMI 或 IF12 完全培养基
7.5%（*V/V*）SRBC 或 15%TNP-SRBC（见辅助方案 3）
从培养细胞中洗涤的 B 细胞（见基本方案 1）
完全培养基里的 50%（*V/V*）豚鼠补体（如 Life Technologies，Colorado Serum）
120cm² 玻璃培养皿
96 孔 U 形底微量滴定板

Cunningham-Szenberg 小室（见辅助方案 2）

玻片托盘（如 CO_2 培养箱里面的托盘）

10 倍的解剖显微镜（可选）

注意：所有的试剂都应该预热至室温以免培养中在小室内形成气泡。

1. 用加热板在 120cm² 的玻璃培养皿里熔化组织制备级的蜡。将加热板调至较低的温度以维持蜡的熔化状态。
2. 加入 50μl（每种）含添加物的 RPMI 或 IF12 完全培养基、7.5%SRBC 或 15%TNP-SRBC、从培养细胞中洗涤过的 B 细胞，和完全培养基中 50%豚鼠补体到 96 孔 U 形微量滴定板的孔中。通过将 SRBC 与豚鼠补体冰上孵育 30min 以去除血清中的溶血抗体（每 10ml 加入大约 1ml 洗涤压积 SRBC 或 TNP-SRBC），这种 SRBC 吸收过的豚鼠补体用于实验。
3. 将孔内成分混合并缓慢转移至 Cunningham-Szenberg 小室。将枪头保持在小室开口

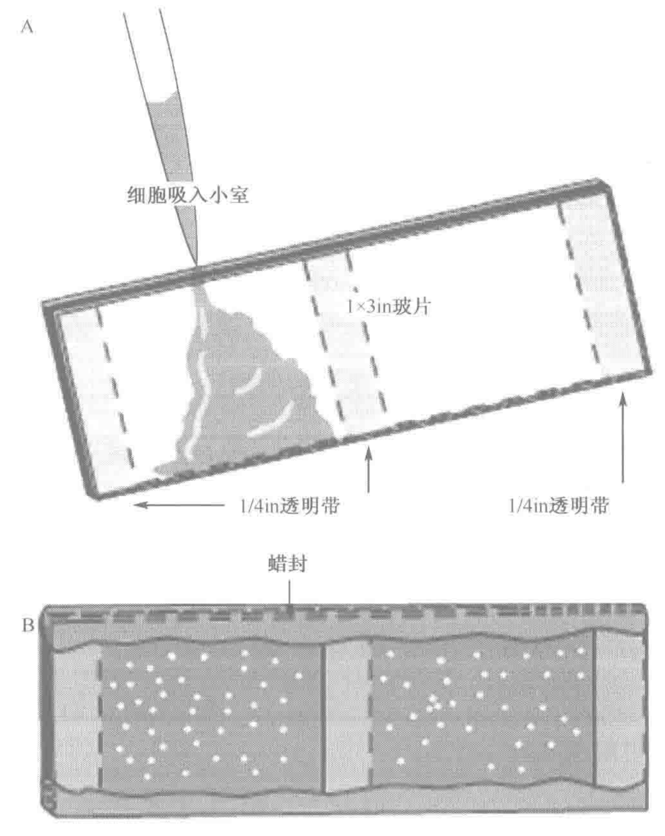


图 2.5.2　A. 玻片小室示意图。三个矩形阴影区代表放置两边的 1/4in 透明带。同时如图所示安放吸管并加入混有 SRBC 和补体的细胞。B. 产生 PFC 后一个完整的玻片小室的示意图。白点代表在加入玻片小室的细胞、SRBC 和补体的混合物所形成的薄胶里的空斑。

的角上（图 2.5.2A）。

转移的细胞数目应该调整为不多于 75～100PFC/小室。

4. 将它们浸没在热蜡中使小室的两边封闭（步骤 1）。将玻片放置于玻片架上或 CO_2 培养箱的托盘上。并在 37℃条件下培养 1h。
5. 用肉眼或者用 10 倍解剖显微镜计数空斑（通过模糊的边缘和没有反射性的特性与气泡相区别；图 2.5.2B），轻轻移动玻片防止摇晃，避免扰乱单层。

备选方案 1　改良 Jerne-Nordin PFC 测定法用于型特异性反应

Jerne-Nordin PFC 测定法（见基本方案 2）可以改良以测定除 IgM 以外的其他 Ig 类型。为达到这个目的，先按照 Jerne-Nordin PFC 测定法步骤 1～4 进行。然后，在加有 TNP-SRBC 的玻璃管里加入 50μl 稀释的羊抗 IgM（如 1∶100；凭经验决定）（步骤 5）以抑制 IgM 的检测。同时，加入 50μl 稀释的（如 1∶200；凭经验决定）兔对需要测定的 Ig 同型（如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgA）的抗血清。检测 1 或 2 张玻片然后加工玻片（步骤 6～10）。于 37℃培养 90～120min。加入豚鼠补体完成测定（步骤 12～16）。

备选方案 2　改良 Jerne-Nordin PFC 测定法用于测定多克隆抗体反应

除了测定特异同种型的反应（见备选方案 1）外，Jerne-Nordin PFC 测定法（见基本方案 2）也可以被改良测定多克隆抗体反应。这种方法利用葡萄球菌 A 蛋白结合兔抗体的能力以及相对容易得到的兔源性抗小鼠 Ig 同种型。分泌的抗体可以接合于连接在蛋白质 A 的兔抗同种型抗体上，整个复合物能固定补体从而溶解 RBC。

为完成这个方法，用氯化铬包被蛋白质 A 于 SRBC 上（见辅助方案 4）。如前所述准备玻璃管（见基本方案 2，步骤 1～4），但只是在 43℃水浴的条件下每管加入 300μl 琼脂糖（步骤 4）。然后准备玻璃管（步骤 5），但不是将 50μl TNP-SRBC 分配到管中（步骤 5），而是加入 30～40μl 蛋白质 A-SRBC（即作为靶细胞使用）。加入 50μl（凭经验决定）稀释的兔抗 IgM、IgG 或 IgA 同种型。检测玻片（步骤 5），颜色应为淡红。再加入细胞（步骤 6），但是只使用 10～20μl 来源于洗涤过的细胞板中的细胞，因为多克隆反应通常比抗原特异性的反应强。完成剩余的步骤（见基本方案 2，步骤 6～16）。

辅助方案 1　制备琼脂糖包被的玻片

材料（带√项目见附录 1）

70%乙醇
SeaPlaque 低熔点琼脂糖（FMC Bioproducts）
一端磨砂的载玻片（如 Gold Seal Rite-ON 载玻片，Fisher）
玻片架和染色缸（Fisher）
烤箱
100ml 玻璃瓶
43℃水浴
√载玻片盘

涂料刷（可选）

玻片盒

1. 将一端磨砂的载玻片放在玻片盒上。将它转移至含 70%乙醇的染色缸中浸泡。移出架子在烤箱内放置 10min 使玻片干燥。将玻片冷却至室温。
2. 在 100ml 玻璃瓶中制备 1.6%（*m/V*）低熔点琼脂糖溶液（每 20ml 水里加入 0.32g 琼脂糖）并摇晃。
3. 用微波炉加热玻璃瓶，使琼脂糖沸腾 20s 以确保所有琼脂糖都溶解。将琼脂糖瓶放在 43℃水浴中。
4. 将玻片放在玻片盒上，磨砂的一面向上。

5a. 用涂料刷制备玻片：用 21.3ml 温水稀释 2.0ml 的 1.6%琼脂糖（步骤 2）制备 0.15%琼脂糖。用涂料刷将 0.15%的琼脂糖包被在玻片上，将玻片放于玻片盒中。

5b. 通过浸没制备玻片：将玻片放在玻片盒内，浸泡至含 200ml 0.15%琼脂糖［即 181.25ml 温水中含 18.75ml 1.6%琼脂糖（步骤 2)］的染色缸中 1min。

6. 在干烤箱内干燥玻片至少 60min。将玻片冷却并保持在玻片盒里。包被的玻片可以在室温中保存几个月。

辅助方案 2 制备 Cunningham-Szenberg 小室

材料

70%乙醇

3in×1in×0.93～1.05mm 载玻片

玻片架和染色缸（Fisher）

干烤箱

0.25in 双面胶（如 3M）

滚筒（如 25ml 移液管或者类似的圆形物体）

1. 将 3in×1in×0.93～1.05mm 载玻片放于玻片架上。将它转移至含 70%乙醇的染色缸内浸泡。移出玻片架将玻片在干烤箱内干燥 10min。然后使玻片冷却至室温。
2. 将 15～30 个玻片靠近排放，但是互相不接触。
3. 将 0.25in 双面胶贴于玻片两端和玻片的中间使得玻片被分成了两个 100μl 部分（图 2.5.2A)。
4. 撕开双面胶的背面，将另一个玻片对齐粘上。
5. 用滚筒轻轻地压玻片以使双面胶贴牢。使用的时候用刀片裂开玻片之间的胶带。

辅助方案 3 三硝基苯半抗原（TNP）偶联 SRBC

材料（带√项目见附录 1）

双甘氨肽（改良的巴比妥缓冲液）

√1×MBB

2,4,6-三硝基苯磺酸（TNBS)，钠盐

√0.28mol/L 二甲砷酸盐缓冲液，pH6.9

从同一绵羊采集的血液，<4周龄（通常从多只绵羊中筛选PFC反应最佳和洗涤中自发性溶血最少的SRBC；见基本方案3；在4℃可保存4周）

15ml刻度锥底离心管

10ml注射器和18G针头

1. 用20ml 1×MBB溶解12.6mg双甘氨肽。
2. 使用之前用7ml 0.28mol/L pH6.9的二甲砷酸盐缓冲液溶解20mg 2，4，6-三硝基苯磺酸钠（TNBS）。
3. 用10ml注射器和18G针头将从同一绵羊来源的4.5ml血液转移至有刻度的15ml锥底离心管中，以维持储存SRBC无菌。
4. 往管里加入1×MBB至14.5ml刻度。20～25℃，800g离心5min。弃上清，轻轻吹打重悬沉积物，重复洗涤一遍。上清如果是淡红色应该再洗涤一遍。如果第三次洗涤后上清不清亮，则另外取新鲜的SRBC用于研究。检查RBC压积是否约1ml。
5. 用14.0ml 0.28mol/L pH6.9的二甲砷酸盐缓冲液洗涤RBC沉淀物。
6. 向洗涤过的SRBC沉积物逐滴加入TNBS溶液（步骤2）并吹打重悬。用锡箔纸覆盖管口在室温下轻轻摇动10min。
7. 用15ml含刻度的锥底离心管同步骤4加入8ml 1×MBB后离心。弃上清后用双甘氨肽15ml洗涤（步骤1）。
8. 弃上清后同步骤4用1×MBB洗涤2遍。上清如果是淡黄色或淡红色应该再洗涤一遍（最多洗3或4次）。如果上清不清亮，则应另取存放时间较短的更新鲜的SRBC用于研究。
9. 弃上清后用锥底离心管刻度估计压积SRBC的体积。加入1×MBB制备13%（V/V）或15%SRBC悬液分别用于Jerne-Nordin（见基本方案2）或Cunningham-Szenberg（见基本方案3）测定。在4℃可以保存一周，每次用之前进行洗涤。

辅助方案4　蛋白质A偶联SRBC

材料

绵羊红细胞（SRBC）悬液（Colorado Serum）

生理盐水：0.15mol/L NaCl（Life Technologies）

生理盐水溶解的1.0mg/ml蛋白质A（Pharmacia或Sigma-Aldrich）

六水合氯化铬（III）

15ml锥底离心管

摇床

注意：磷酸盐缓冲液（PBS）不能在这些步骤里使用。

1. 向15ml锥底离心管加入2.5ml SRBC悬液。用生理盐水充满并混匀。台式离心机4℃，800g离心10min。弃上清后至少用盐溶液再洗涤2遍（直至上清清亮）。
2. 估计压积体积。如果SRBC压积小于0.5ml，返回步骤1加大SRBC的用量重新开始。如果SRBC压积大于0.5ml，那么返回步骤1减少SRBC的用量重新开始。加入生理盐水溶解的0.5ml的1.0mg/ml蛋白质A，轻柔混匀。

3. 将 13.3mg 氯化铬溶解在 10ml 生理盐水里制备新鲜的 10×氯化铬储存液。1∶10 稀释成 1×溶液。向蛋白质 A 和 SRBC 混合物中（步骤 2）逐滴加入 5.0ml 1×氯化铬（III）并不停轻摇离心管。在摇床上轻微摇动并于室温培养 1h。
4. 将离心管充满生理盐水，4℃，800g 离心 5min。用 15ml 生理盐水通过离心洗涤蛋白质 A 偶联的 SRBC 两次后用生理盐水重悬至终浓度 15%（*V/V*）。如果在偶联之前或之后甚至 3 次洗涤的上清都呈红色或淡红色，则应丢弃该 SRBC，重新使用新鲜的（不超过几周）SRBC。蛋白质 A-SRBC 可以保存在 4℃长达 48h。

辅助方案 5　制备 TNP-卵白蛋白

此方法可用于将 TNP 家族偶联至多种其他蛋白质，包括 KLH、BSA 及人或牛免疫球蛋白 γ。

材料（带√项目见附录 1）

卵白蛋白（Sigma-Aldrich）
√0.1mol/L 碳酸氢钠溶液
TNBS
1×生理盐水
锡箔纸

注意：本单元的计算假定 1.0mg/ml 卵白蛋白的 OD_{280} 为 0.587，TNBS 的摩尔消光系数为 $1.25\times10^4 M^{-1}\cdot cm^{-1}$。

1. 用 1.0ml 的 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液溶解 20mg 的卵白蛋白（43 000g/mol）。
2. 用 1.0ml 水溶解 15mg TNBS（293g/mol）制备 51.2mmol/L 溶液。
3. 向 2.5ml 卵白蛋白溶液（步骤 1）缓慢加入 0.317ml TNBS 溶液并不断搅拌使 TNBS 比卵白蛋白多 13 倍。覆盖锡箔纸，轻轻摇荡 4℃过夜使反应发生。
4. 用 2L 盐水透析反应物 5 遍。
5. 测定 OD_{280} 和 OD_{340}。校正 OD_{280} 得出 TNP 族的吸光率：

$$OD_{280}校正=OD_{280}-0.337\times OD_{340}$$

6. 用每毫升的毫克数计算卵白蛋白的浓度：

$$卵白蛋白(mg/ml)=OD_{280}校正/0.587$$

7. 用每升的摩尔数计算卵白蛋白的浓度：

$$[卵白蛋白]=卵白蛋白(mg/ml)/43\,000$$

8. 用 mol/L 计算 TNP 的浓度：

$$[TNP]=OD_{340}/1.25\times10^4$$

9. 计算 TNP 和卵白蛋白的比率：

$$TNP/卵白蛋白=摩尔\ TNP/摩尔卵白蛋白$$

辅助方案 6　用 Percoll 梯度离心纯化静息 B 细胞

材料

1×和 10×Hanks 平衡盐溶液（HBSS），不含钙镁（Life Technologies），4℃

Percoll（Pharmacia LKB 或 Sigma-Aldrich）
1mol/L HEPES
1mol/L HCl
15ml 和 50ml 聚丙烯离心管
Sorvall RT6 台式离心机和 H-1000B 转子或者等值的转子

1. 制备脾脏细胞（单元 2.1）。用抗 Thy-1、抗 CD4、抗 CD8 抗体以及兔补体去除 T 细胞。每个脾脏用 1.0ml 不含钙镁的 1×冷 HBSS 重悬细胞。
2. 如下制备 90%Percoll：
   90ml Percoll 原液
   9ml 10×无钙镁的 HBSS
   1ml 1mol/L HEPES
   0.45ml 1mol/L HCl
3. 用冷 HBSS 制备 2.7ml 表 2.5.2 中所列的各种浓度的 Percoll 溶液。

表 2.5.2　Percoll 梯度溶液的配方

Percoll 浓度/%	90%（V/V）Percoll/ml	HBSS[a]/ml	密度/(g/ml)
70	2.1	0.6	1.086
65	1.98	0.72	1.0815
60	1.8	0.9	1.074
50	1.5	1.2	1.062

a. HBSS 应该不含钙镁。

4. 在带盖的 15ml 锥底离心管里按如下顺序轻轻滴入不同浓度的 Percoll 溶液各 2.5ml 以制备浓度梯度（从底部开始）：70%、66%、60%和 50%Percoll。
5. 将 1～2ml 最多含 1×10^8～2×10^8 个的细胞铺于 50%Percoll 层上。沿着管壁缓慢加入细胞悬液以免破坏梯度。在低温离心机内预冷 20min 至 4℃。
6. 4℃，1900*g*（3000r/min）用带 H-1000B 转子的 Sorvall 台式离心机离心 20min。
7. 去除 50%Percoll 层上面的 HBSS 和细胞，然后去除其他层，收集每个不同浓度界面间的细胞至 50ml 离心管中。
8. 用冷 HBSS 充满离心管并混匀以稀释 Percoll。4℃，300*g* 离心 15min。再用冷 HBSS 洗涤细胞 2 遍。

运用此方法得到的位于 65%和 70%Percoll 间的细胞是静息细胞，可用流式细胞仪进行验证。用 FACS 进行分析，静息细胞的前向散射角较小。位于 50%和 60% Percoll 上面的是活化的细胞。位于 60%和 65%之间的大多数也是静息细胞，也可能污染一些活化的细胞，如果需要使用大量的静息细胞也可以使用这些细胞。

通常静息 B 细胞的回收率为 12%～20%。如果低于 12%，有时可以从整个脾脏细胞中先分离静息细胞，然后用抗 T 细胞抗体和补体处理从而去除 T 细胞。如果需要，污染的 RBC 可以用 ACK 裂解缓冲液（单元 2.1）或者 Gey 溶液（单元 2.6）去除。

参考文献：Mond *et al*., 1995；Pecanha *et al*., 1991

撰 稿 人：Subbarao Bondada and Darrell A. Robertson

单元 2.6 B 淋巴细胞活化的早期事件

本单元主要介绍检测各种刺激剂诱导的 B 细胞活化的方法。

注意： 所有接触细胞的液体及设备必须是无菌的，而且相应地应该采用正确的无菌操作技术。除非特别说明，所有培养孵育应该在含 5%二氧化碳的饱和湿度的 37℃条件下进行。

基本方案 1 BCR 诱导的 B 细胞内钙变化

材料（带√项目见附录 1）

√Gey 溶液，4℃
√Hanks 平衡盐溶液（HBSS）/5%（*V*/*V*）FBS
√含 10%（*V*/*V*）FBS 的 IF12 或 RPMI 培养基
DMSO，无水的
INDO-1 AM（也写作 Indo-1，Molecular Probes）
FITC-抗 B220（Sigma 或 BD PharMingen）
生物素化抗 BCR 和抗 CD19（可选）
√HBSS，4℃
1.0mmol/L 伊屋霉素（ionomycin）——译者注（Calbiochem）
F（ab′)$_2$抗 IgM（μ 链特异性；ICN Biomedicals）或抗 IgD（BD PharminGen 或 Southern Biotechnology）
不含钙的培养基和 1.0mmol/L $CaCl_2$（可选）
12mm×75mm 适合指定流式细胞仪的带盖的流式管
流式细胞仪（即 BD PharMingen FACS Vantage、Beckman-Cowlter Cytomics FC-500 或 EPICS、Cytomation Mo-Flo 或者含有能激发紫外光区的 Indo-1 与可见光区的 FITC 和 PE 的激光器的任何仪器）

1. 按单元 2.1 所述方法制备小鼠脾细胞。每个脾加入 5ml 冰冷 Gey 溶液于冰上处理脾细胞 3min 来裂解红细胞。
2. 用 5ml HBSS/5% FBS 漂洗细胞 3 次。用含 10% FBS 的 RPMI 或 IF12 培养基重悬细胞至终浓度为 10×10^6 个细胞/ml（任一液体可以用于整个检测）。如果需要，小量静息的 B 细胞可通过经 Percoll 梯度液分离纯化 B 细胞（CPI 单元 3.4）之后采用抗 T 细胞抗体及补体（单元 2.5）或采用磁珠去除 T 细胞来进一步纯化（可选）。
3. 在 50μg INDO-1 AM 加入 50μl DMSO 制备新鲜的 Indo-1 溶液。通过预实验检测荷载 100%细胞而不影响细胞活力所需要的量，来确定其最佳使用浓度（如 2～10μmol/L）。
4. 采用最佳浓度的 Indo-1 荷载 B 细胞，在适用流式细胞仪的带盖的 12mm×75mm 管子中将 5μl Indo-1 与 10×10^6 个细胞混合成总体积 1ml。松盖在 37℃孵育 30min。

5. 将荷载 Indo-1 的细胞转移到一个冰槽中。按每 1.0×10^6 个 B 细胞加入 1.0μg FITC-抗-B220（或与藻红蛋白偶联的 CD5、CD23 或 CD2 抗体）。在冰上孵育 30min，然后用冷 HBSS 漂洗。用含 10% FBS 的冷 IF12 重悬。保持细胞在冰上直到使用。如果想要更强的钙信号，在设置了 FACS 的基准后（步骤 9），加入生物素化的抗 BCR 和 CD19 抗体和 5 倍的亲和素。
6. 在 37℃水浴中加温 30ml 含 10% FBS 的 IF12 培养基。将 Indo-1 荷载的细胞、预温的培养基，以及水浴锅带到流式细胞仪所在的实验室。
7. 将 100μl 1.0×10^6 个细胞转移到另一个 12mm×75mm 管子并加入 0.9ml 预温的 IF12/10% FBS。在 37℃进行热均衡 2min。
8. 设定流式细胞仪在 350nm 激发 Indo-1 并在 405nm（FL2）与 485nm（FL1）检测荧光。计算 FL2（钙结合）与 FL1（钙非结合）的比率。
9. 检测背景紫色光（405nm）与蓝色光（485nm）的比率共 1min，然后加入 2μl 1.0mmol/L 伊屋霉素。将管子涡旋混匀然后检测荧光共 4min（荧光值将快速升高并达到平台期，随后开始下降。）
10. 重复步骤 7 并检测背景荧光值 1min。加入 50μg 抗 IgM（μ 链特异性）或抗 IgD，漩涡混匀，并立即按步骤 8 检测荧光比率共 5～8min（荧光值的升高将比使用伊屋霉素的慢）。
11. 可选：为了区别细胞内钙释放与细胞外钙流入，细胞可采用无钙培养基重悬以用于研究（FBS 也必须透析以去除任何钙离子）。随后，可加入 1.0mmol/L $CaCl_2$ 来观察细胞外钙内流。
12. 按 CPIM 单元 5.5 中 Rabinovitch 的描述计算钙的浓度。

基本方案 2　蛋白质酪氨酸磷酸化的分析

材料（带√项目见附录 1）

√无血清 IF12 或 RPMI 培养基（单元 3.8）
25μg/ml $F(ab')_2$ 抗 IgM（μ 链特异性；ICN Biomedicals）
√1×PBS，pH7.2，含有及不含磷酸酶抑制剂（即 10mmol/L NaF 与 1mmol/L Na_3VO_4），4℃
√裂解缓冲液（见配方）
BCA 蛋白测定试剂（Pierce）
√溶于 1× TBST 的 1.5% BSA（见配方）
溶于1.5% BSA/1×TBST 的 RC20：HRPO（BD PharMingen、Transduction Laboratories）或 HRP-结合的 4G10（Upstate）抗磷酸酪氨酸抗体
√1× TBST 溶液
增强化学发光试剂盒（Perkin-Elmer Life Sciences 或 Pierce）
稳定素-P 膜（Millipore）
染料木黄酮（可选）

1. 如前所述（单元 2.5 中基本方案 1）纯化去除红细胞的静息 B 细胞。

2. 于 1.5ml 微量离心管内用无血清 IF12 或 RPMI 培养基重悬细胞至浓度为 25×10^6 个细胞/ml。37℃静置孵育 30min。
3. 用 25μg/ml F (ab′)$_2$ 抗 IgM 刺激静息 B 细胞不同的时间（如 0.5min、1min、5min 及 15min），刺激过程中细胞保持在 37℃。加入 0.5ml 冰冷的含磷酸酶抑制剂的 1× PBS，pH 7.2 终止反应。
4. 4℃，10 000g 离心 B 细胞 1min。用 0.5ml 不含磷酸酶抑制剂的 1× PBS 漂洗 3 次。用 0.5ml 裂解缓冲液重悬漂洗过的 B 细胞。冰上孵育 30min。于 4℃，12 000g 离心 30min 去除裂解液中的核碎片和细胞骨架相关蛋白。
5. 可选：根据厂家说明采用 BCA 蛋白测定试剂检测蛋白质浓度。在 SDS-PAGE 胶不同泳道中上样等量蛋白质。
6. 按单元 12.3 所述，在还原条件下于 10% SDS-PAGE 胶中分离蛋白质。于 200V 电压下电泳 3h，并按单元 12.5 所述，在转膜缓冲液中转移到稳定素-P 膜上。
7. 室温下在摇床上用 1.5% BSA/1×TBST 封闭膜 20min。
8. 室温下在摇床上用 1∶500 的溶于 1.5% BSA/1× TBST 的 RC20∶HRPO 或 HRP-结合的 4G10 抗-磷酸酪氨酸抗体孵育膜 40min。
9. 用 1×TBST 漂洗膜 3 次，每次 10min。最后一次漂洗后，按厂家说明书将膜采用增强化学发光试剂盒中的化学发光试剂孵育。
10. 将膜曝光于放射自显影胶片数秒到几分钟直到在 140～20kDa 可见清晰的条带（PLC-γ 与 CD21，140kDa；Src 激酶，50～56kDa；Syk 激酶，70kDa）。刺激过的细胞将比未刺激的细胞观察到更高强度的一系列条带。
11. 用免疫沉淀方法鉴定蛋白质（单元 12.2）。如果需要，可用静息 B 细胞重复实验来进一步减少背景。同样如果需要，PTK 的作用可通过在木黄酮存在的情况下进行实验来证实。

基本方案 3　细胞大小与 B 细胞活化分子表达的分析

材料（带√项目见附录 1）

纯化的静息 B 细胞（单元 2.5）
√含 5%（*V/V*）FBS 的 IF12 或 RPMI 培养基
25μg/ml F (ab′)$_2$ 抗 μ（ICN Biomedicals）、1.0μg/ml 抗 CD40（克隆 1C1D；Southern Biotechnology 或 eBioscience）或 1.0μg/ml LPS (Sigma)
√FACS 缓冲液
10μg/ml 2.4G2 抗 Fc 受体抗体（BD PharMingen 或 ATCC ＃HB-197）
FITC-抗鼠-MHC II 类分子（BD PharMingen，Sigma，或其他公司）：克隆 MKD6（等位基因特异的）、14.4.4（等位基因特异的）及 M5/114.5.2（种属特异的），-CD80（小鼠特异的）、-CD86（小鼠特异的）或-CD138（小鼠特异的）。
√1× PBS（附录 2A）
√固定液（可选）
PE 标记的抗 B220 抗体（可选）

96、48 或 24 孔培养板

1. 用含 5% FBS 的 IF12 或 RPMI 培养基培养纯化的静息 B 细胞（来源于未免疫动物的全脾细胞或去除 T 细胞的脾细胞），细胞密度为 1.0×10^6 个细胞/ml，对 96、48 及 24 孔培养板体积分别为 0.2ml、1.0ml 及 2.0ml。
2. 根据所要分析的实验数目设定 96、48 或 24 孔培养板的培养复孔为 3 孔。用 25μg/ml F（ab′）$_2$抗 μ、1.0μg/ml 抗 CD40 或 1.0μg/ml LPS 刺激 B 细胞。
3. 培养 18～96h 后收集细胞并用 FACS 缓冲液漂洗细胞。
4. 预留一个含 0.2×10^6～1.0×10^6 个未标记细胞的样本。分配其余细胞使每管含 0.2×10^6～1.0×10^6 个细胞。在台式离心机上 4℃，400*g* 离心 5min。弃上清。
5. 用 100μl FACS 缓冲液重悬细胞，加入 10μg/ml 2.4G2 抗-Fc 受体抗体（或正常小鼠、大鼠或人 IgG）4℃预孵育 5min。
6. 无需漂洗，直接加入 1.0μg FITC-抗小鼠-MHC class II（克隆 MKD6，14.4.4 或 M5/112.4）、-抗 CD80、-抗 CD86 或-抗 CD138 抗体标记细胞。冰上孵育细胞 30min。
7. 加入 3.0ml FACS 缓冲液到离心管中，4℃，400*g* 离心 5min。弃上清。重复漂洗一次。用 0.5～1.0ml FACS 缓冲液重悬细胞。
8. 可选：用 1× PBS 漂洗一次去除存在的蛋白质，然后固定细胞用于随后的分析。弃上清，用 0.5ml 固定液重悬细胞。4℃可储存 1 周。
9. 在流式细胞仪上分析细胞（第四章）。采用未标记细胞（步骤 4）来检测前向及侧向散射光。
10. 根据前向及侧向散射光来确定活细胞并分析其 FITC 荧光。
11. 可选：如果需要，用 PE 标记的抗 B220 抗体来进一步标记细胞。

参考文献：Thompson *et al.*，1984

撰 稿 人：Subbarao Bondada，Amy Troyer and Ralph L. Chelvarajan

单元 2.7　B 细胞功能的增殖检测方法

基本方案　抗 IgM 与 LPS 刺激的 B 细胞增殖

材料（带√项目见附录 1）

纯化的静息 B 细胞（单元 2.5），采用 Percoll 梯度离心制备

√DMEM-10 完全培养基

山羊抗 IgM（Jackson Immunoresearch）或细菌 LPS（*E. coli*；Difco #011B4）

0.1mCi/ml 溶于 HBSS（附录 1）的［^{3}H］胸腺嘧啶（20Ci/mmol/L；Du Pont NEN）

15ml 聚丙烯管（Falcon）

96 孔平底微孔板（Costar）

直接收集细胞到玻璃纤维板条的收集系统（PHD Harvester，Cambridge Technologies）

1. 在 15ml 离心管中，用含添加物的 DMEM-10 培养基制备纯化的静息 B 细胞悬液，浓度为 10^6 个细胞/ml（一般≥10ml DMEM-10/板）。
2. 用含添加物的 DMEM-10 制备山羊抗 IgM（2～200μg/ml）或 LPS（1～100μg/ml）的工作液，刺激物至少应有 3 个浓度范围。

   有些山羊抗 IgM 抗体制备物比其他的具备更强的促分裂能力。但是无论如何当抗 IgM 抗体通过偶联到琼脂糖珠子而变成固相试剂时其促分裂能力将会增强（Puré and Vitetta，1980）。改善促分裂能力的另一种方法是使用 F（ab′）$_2$ 片段（单元 1.6、1.7、2.6）而非整抗体以避免 Fc 受体介导的增殖抑制（当使用兔抗 IgM 时这个方法是非常重要的）。单克隆大鼠抗 IgM 抗体也能用作丝裂原，但是与多克隆抗体的情况一样，它们以这种方式作用的能力是可变的。最后，在大多数情况下抗 IgD 抗体可代替抗 IgM 抗体使用。

3. 向 96 孔培养板的三孔中加入 0.1ml 含添加物的 DMEM-10 作为阴性对照。于其他孔的 3 复孔组合中，加入 0.1ml 三种浓度中任一浓度的刺激剂（步骤 2 中）。
4. 向每孔加入 0.1ml 纯化的 B 细胞悬液（来自步骤 1；终浓度为每孔 10^5 个细胞）。颠倒管子混匀细胞以确保一致的细胞悬液。
5. 将培养板放置在饱和湿度的 37℃，5% CO_2 培养箱中 24～72h（孵育时间根据经验来确定，24h 时大细胞及细胞团块的存在代表良好的细胞增殖）。

   培养箱的湿度，温度和 CO_2 水平是影响细胞活力继而增殖反应强弱的重要因素。对于如前所述的小鼠 B 细胞的体外培养，5%CO_2 环境是最好的。可以将一金属盘盛满含有抑菌物的去离子水放在孵箱底部的托盘下面来维持湿度。每 2 周更换盘内的水。37℃的准确温度非常重要。高于或低于此温度的一个很小的波动都对细胞生长有巨大的影响。

6. 用多道移液器向每孔中加入 0.1ml 0.1mCi/ml [^{3}H] 胸腺嘧啶。将培养板放回饱和湿度的 37℃，5% CO_2 培养箱中最后培养 16h（作用时间长度不是很重要）。
7. 用 PHD 收细胞仪器收细胞到玻璃-纤维盘上或冻存于－20℃以备以后收集。
8. 将盘加入到含 1.5ml 闪烁液的小瓶中并用 β 液闪仪检测 cpm。
9. 依单元 2.11 基本方案 1 中的步骤 9 所述方法计算数据。

备选方案 1　用 8-巯基喹啉（8-MG）刺激 B 细胞多克隆活化

附加材料（见基本方案）

8-MG (Sigma)
0.1mol/L NaOH
2mol/L HCl

1. 如果 8-MG 被作为唯一的 B 细胞激活剂，则采用位于 50%与 60% Percoll 间纯化的 B 细胞，而非位于 70% Percoll 区带的静息 B 细胞（单元 2.5）。
2. 准备 2mmol/L 8-MG 液体：将 5mg 8-MG（Sigma）溶解于 0.3ml 0.1mol/L NaOH，加入 7.0ml 含添加物的 DMEM-10 并用 2mol/L HCl（15μl）调节 pH 至 7.0。
3. 按基本方案步骤 3 单独将 0.05ml 2mmol/L 8-MG 或将其与抗 Ig（0.5mmol/L 终浓

度）联合加入到 96 孔培养板中，每孔最终体积为 0.2ml。

4. 继续基本方案步骤 4～9。

备选方案 2　用蛋白激酶 C 激活剂及钙离子载体刺激 B 细胞多克隆活化

附加材料（见基本方案）

1mmol/L 溶于乙醇的 PMA 与 PDBU（Sigma）
10mmol/L 溶于乙醇的 indolactam（LC Services）
1mmol/L 溶于乙醇的伊屋霉素（Calbiochem）

1. 采用含添加物的 DMEM-10 准备 PKC 激活剂与钙离子载体的工作液（每种设置三个稀释浓度）：
   0.04～4.0μmol/L PMA 与 PDBU
   0.04～4.0μmol/L indolactam
   0.4～4.0mmol/L 伊屋霉素
2. 按基本方案步骤 3 将 50μl PKC 激活剂与 50μl 伊屋霉素按每一稀释浓度（来自步骤 1）加入到 96 孔培养板（培养孔中终浓度为：PMA 与 PDBU，0.01～1.0μmol/L；indolactam，0.01～1.0μmol/L；伊屋霉素，0.1～1.0mmol/L）。
3. 继续基本方案步骤 4～9。

备选方案 3　硫酸葡聚糖与 poly（I∶C）刺激 B 细胞多克隆活化

附加材料（见基本方案）

10mg/ml 硫酸葡聚糖（GIBCO/BRL）
100mg/ml poly（IC）（Sigma）

1. 采用含添加物的 DMEM-10，准备 20～200μg/ml 硫酸葡聚糖或 1.0～10mg/ml poly（IC）的工作液。
2. 按基本方案步骤 3，将 0.1ml 每一稀释浓度的丝裂原（在抗 Ig 不存在的条件下）加入到 96 孔培养板 [最佳终浓度是 50μg/ml 硫酸葡聚糖与 100μg/ml poly（IC）]。
3. 继续基本方案步骤 4～9。

备选方案 4　细胞数量增加的定量

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

√磷酸缓冲盐（PBS）
用 PBS 制备的 0.5mol/L EDTA（冰冷的）
冰冷的 95% 乙醇
1mmol/L Hoechst 33342（Sigma）
1mmol/L 派洛宁 Y（Sigma）
5ml 圆底离心管（Falcon）
双激光流式细胞仪（如 FACScan、Becton Dickinson；单元 4.2）

1. 在 24 孔培养板中，加入静息 B 细胞（2×10^6 个细胞/孔）与感兴趣的刺激剂的液体使总体积达 2ml（见基本方案，步骤 1～3）。对照应包括单独培养基、静息（G_0）细胞与对数生长期细胞。在饱和湿度的 37℃，5% CO_2 培养箱中培养 24～48h。
2. 在每孔中，用巴氏吸管重悬细胞并转移 1～5ml 到试管中。加入 2ml PBS 并用 IEC 216 转头于 4℃，170*g* 离心 5min，尽可能吸弃上清。
3. 用 0.25ml 冰冷的 0.5mol/L EDTA 重悬细胞并涡旋混匀 2s。加入 0.75ml 冰冷的 95%乙醇并再次涡旋混匀。将离心管置于－20℃冰箱 30min（如无需立即检测可冷藏 1 周）。
4. 每个离心管加入 2ml PBS。按步骤 2 离心并完全吸弃上清。
5. 用 1ml 冰冷的 0.5mol/L EDTA 液重悬细胞，加入 10μl 1mmol/L Hoechst 33342，涡旋混匀 2s，并在 37℃孵育 1h。
6. 用水以 1∶10 稀释 0.1mmol/L 派洛宁 Y 并加入 40μl 的这种稀释液到步骤 5 中的每个离心管。涡旋混匀 2s 并将离心管置于冰上直到分析时。
7. 对于流式细胞分析，设定 FACScan 激光波长为 350nm 与 530nm。Hoechst 33342（DNA）与派洛宁 Y（RNA）的发射光分别在 400～500nm 和大于 580nm 处检测。
8. 计数 10 000 个细胞，将 Hoechst 与派洛宁 Y 处理的细胞与静息细胞比较增加的荧光强度来检测不同峰值（单元 4.2）。

参考文献：Mond *et al*.，1990

撰 稿 人：James J. Mond and Mark Brunswick

单元 2.8　BrdU 检测 T 细胞和 B 细胞增殖

基本方案

注意：BrdU 是一种可通过皮肤或呼吸道吸收的潜在诱变剂。因此操作时应穿戴适当的防护服，包括手套、保护眼睛和面部的防护镜。

材料（带√项目见附录 1）

实验动物
0.8mg/ml BrdU（Sigma）水溶液（口服用）或 4mg/ml BrdU PBS 溶液（注射用）
√PBS，pH7.4
0.15mol/L 冰冷的 NaCl
冰冷的 95%乙醇
√多聚甲醛固定液
√DNA 酶 I 溶液
抗 BrdU-FITC（Becton Dickinson Immunocytometry）
15mm×75mm 圆底聚苯乙烯管
能进行三色或四色分析的流式细胞仪

1. 通过饮水（将 0.8mg/ml BrdU 溶解在无菌饮用水中；因 BrdU 对光敏感，因此需每天更换新配的水溶液）给予 BrdU，或采用静脉或腹腔注射 BrdU 浓度为 4mg/ml 的 PBS 溶液，按附录 2E 中的方法每只小鼠注射 0.2ml（0.8mg）。如果需要准确计算初始给药时间，可同时通过注射和饮水给予 BrdU。
2. 取淋巴器官制备单细胞悬液（单元 2.1）。对细胞进行免疫荧光检测（单元 4.1）。如细胞已在微孔板中完成表面标记，将细胞转移到 15mm×75mm 试管中。
3. 采用合适的抗体和荧光素对细胞进行表面标记。如果采用本方案推荐的抗 BrdU-FITC 抗体，那么表面标记不要使用 FITC 交联抗体。
4. 加入 1ml PBS，4℃，300*g* 离心 6min。丢弃全部上清后用 0.5ml 冰冷的 0.15mol/L NaCl 混悬细胞。如采用碘化丙锭区分活细胞和死细胞（单元 4.1），那么在固定和打孔之前再洗（步骤 4～5）4 或 5 遍以去除所有细胞外的碘化丙锭。
5. 轻轻振荡细胞，同时逐滴加入 1.2ml 冰冷的 95%乙醇以避免细胞聚团。冰浴 30min。加入 2ml PBS，4℃，450*g* 离心 6min。
6. 彻底弃上清。用 1ml 多聚甲醛固定液混悬细胞。室温放置 30min，4℃，450*g* 离心 6min。
7. 弃上清。用 1ml DNA 酶 I 溶液混悬细胞。室温放置 10min。加入 2ml PBS，4℃，450*g* 离心 6min。
8. 弃上清。混悬细胞后加入 10μl 抗 BrdU-FITC 抗体，室温孵育 30min。加入 2ml PBS，4℃，450*g* 离心 6min。
9. 用 500μl PBS 混悬细胞。立即进行流式细胞分析（单元 4.2）或者 4℃避光保存不超过一周。

参考文献：Carayon and Bord，1992；Tough and Sprent，1994

撰 稿 人：David F. Tough and Jonathan Sprent

单元 2.9 采用细胞内荧光染料 CFSE 检测淋巴细胞的迁移和增殖

基本方案 淋巴细胞的 CFSE 标记

本方案介绍大量或少量淋巴细胞的 CFSE 标记方法。

材料（带√项目见附录 1）

实验动物，人外周血或者培养的淋巴细胞

√PBS，pH7.4

√Hanks 平衡盐溶液（HBSS）pH7.4

含 5%（*V*/*V*）热灭活 FBS 的 PBS

√5mmol/L CFSE 储存液

√0.5mmol/L EDTA 的 PBS 溶液（用于培养的淋巴细胞）

实验所需的抗原和有丝分裂原

10ml 塑料管（选用）

配备荧光滤片的荧光显微镜

注：细胞标记 CFSE 后不能马上检测，因为这时的荧光强度极高。细胞摄入的大部分 CFSE 尚不稳定，在随后的几天内会逐渐丢失。

1a. 细胞数较多时：用附录 2H、单元 2.1 和单元 8.1 中介绍的方法制备淋巴细胞，人 PBMC 用 PBS（无血清）混悬至 50×10^6 个细胞/ml，小鼠淋巴细胞用 HBSS（无血清）混悬至相同浓度。

1b. 细胞数量较少时：用含 5%FBS 的 PBS（蛋白质可减弱 CFSE 的毒性）混悬新鲜分离的淋巴细胞，使浓度为 $0.5\times10^6\sim10\times10^6$ 个细胞/ml。

1c. 培养的淋巴细胞：不要离心静息的淋巴细胞。将标记试剂直接加在含 10% FBS 的培养基中。

2. 用 PBS 将 5mmol/L CFSE 储存液按 1/100 比例稀释（50μmol/L 浓度）。每毫升细胞悬液中加入 110μl 上述溶液并迅速混匀。例如，将细胞悬液加入 10ml 塑料管，保持塑料管竖直，将 CFSE 加在管壁干燥的部分。保持竖直的塑料管盖上盖子后迅速颠倒几次混匀。或者一边振摇细胞一边加入等体积的预先稀释至 10μmol/L 的 CFSE。如果上述方法用于大量细胞，应将淋巴细胞浓度从 50×10^6 个细胞/ml 提高至 100×10^6 个细胞/ml。如果计划在 24h 以内检测 CFSE 标记的细胞，应采用常用 CFSE 浓度的 1/4 或 1/8 进行标记。

3a. 分离的淋巴细胞：室温孵育 5min 后，加入 10 倍体积的含 5% FBS 的 PBS，20℃，300*g* 离心 5min，弃上清。洗 3 遍，每遍加入 10 倍体积的含 5% FBS 的 PBS，20℃，300*g* 离心 5min，弃上清。

3b. 培养的淋巴细胞：用 PBS 洗涤过后加入 0.5mmol/L EDTA 的 PBS 溶液孵育 5min 去除团块。再用 PBS 洗一遍后用培养基混悬备用。

4. 将 CFSE 标记的淋巴细胞用不含蛋白质（无血清）的组织培养基混悬后静脉注射（i.v.）至受者动物体内。如实验对象为小鼠，则将 $1\times10^6\sim40\times10^6$ 个细胞在 0.1～0.2ml 的液体中注入尾静脉（注射超过 50×10^6 个细胞会使小鼠淋巴器官达到饱和；在此饱和点之前注射细胞数与进入淋巴器官的细胞数呈线性关系）。

   通过采用不同的 CFSE 标记浓度可以同时追踪两种不同的淋巴细胞群体。一群细胞以 5μmol/L 的 CFSE 标记（步骤 1a 和 1b），另一群以常用浓度的 1/4（1.25μmol/L）或 1/16（0.312μmol/L）进行标记。

   24h 内检测过继到动物体内的细胞时，为避免流式细胞仪上出现超出检测范围的荧光强度，应采用常用浓度的 1/4（1.25μmol/L）或 1/8（0.625μmol/L）进行标记（步骤 1 和 2）。

5. 用带滤光片的荧光显微镜观察淋巴器官和其他组织中 CFSE 标记细胞的位置，或采用荧光素的特异性抗体进行免疫组织化学检测（Garton and Schoenwolf，1996；Graziano *et al.*，1998）。用荧光显微镜观察 CFSE 标记的细胞时，取出动物器官，切成约 3mm 的薄片，放于载玻片上观察。

   在荧光显微镜下观察会让 CFSE 荧光迅速淬灭，用传统组织学染色会使其完全

淬灭。如需较低解像度进行短时间定位分析，推荐使用 H33342（Parish，1999）。如需较高解像度定位研究，推荐用组织切片的免疫组织化学方法检测 CFSE 标记细胞。

6. 用培养基混悬 CFSE 标记的细胞，在体外用抗原或有丝分裂原刺激（单元 2.7、2.11、8.8、8.9）。

7a. 获取体内细胞：收集淋巴器官，制成单细胞悬液（附录 2H 和单元 2.1）。

7b. 收获同一种体外培养细胞：收集培养细胞，用 3ml PBS 洗一遍，用 2ml 0.5mmol/L EDTA/PBS 混悬，37℃孵育 5min 分解细胞团块。20℃，300g 离心 5min，用含 5% FBS 的 PBS 混悬细胞后转移至流式管中。如果需要用血细胞计数板进行人工计数（附录 3A），取少量细胞悬液放在另一个离心管中或 V 底板中置冰上保存。

7c. 收获多种体外培养细胞：从 96 孔平底板中收集细胞时，吸取适量上清后将三孔细胞转移至 96 孔 V 底板的一个孔中。采用步骤 7b 的方法加入 150μl EDTA 洗一遍。在培养板架上 300g 离心 2min。用移液器沿孔壁由上向下吸取上清，直到枪头的尖端到达垂直管壁和 V 形底的交界处。在振荡器上振动培养板混匀细胞，随后用多通道移液器加入下一步洗涤试剂。

辅助方案　流式细胞仪分析 CFSE 标记的细胞

本方案总结了对 CFSE 标记细胞的增殖进行定量分析的实验步骤。关于流式细胞分析的更多信息参见第四章。

材料

CFSE 标记的细胞（见基本方案）
能检测三色荧光的流式细胞分析仪
流式细胞分选仪（选用）

1. 根据实验需要对细胞进行流式标记（例如，细胞表面标记，单元 4.1；胞内细胞因子染色，单元 5.8；碘化丙锭染色分析细胞凋亡，单元 2.14）。进行流式细胞分析（单元 4.2）。

对于软件分析

2a. 用合适的软件（如 Quantumsoft's Profit、SPSS Science's Peakfit、Verity Software House's ModFit、Science Speak's CFSE Modeler）对 CFSE 峰值进行分析。

对于人工计算

2b. 记录 CFSE 标记的对照细胞，以及未标记的对照组和刺激组细胞荧光强度的几何均数（未标记的增殖细胞的自发荧光要高于未标记的对照不增殖细胞）。

3b. 从 CFSE 标记的对照细胞荧光强度几何均数中减去相应的未标记细胞对照（如 600－2＝598）。将所得数值换算成 10 的对数（本例为 2.776）。

4b. 确定子代细胞的几何平均荧光强度。子代细胞荧光强度为不增殖细胞荧光峰值的 1/2、1/4……以此类推，所以每分裂一次荧光强度减去 0.3log10。

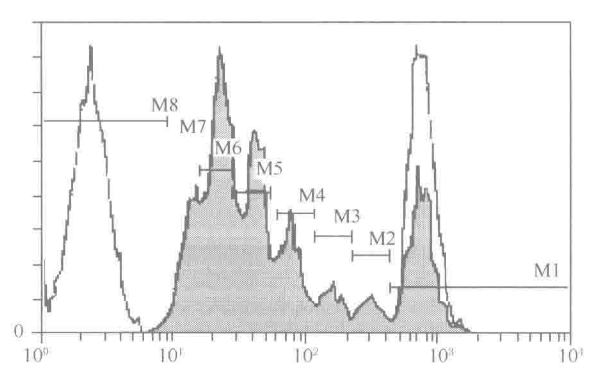
5b. 确定荧光峰值的边界（连续荧光峰值的中间值；如峰值两侧 0.15 log10）。

6b. 将上述参数应用于流式分析软件（如 Cell Quest、Becton Dickinson）分析每个峰值中的细胞百分比。

7b. 对每个峰值中的实际细胞数进行人工计数或计数微球分析。

8b. 用某一峰值中的细胞数除以其相应的预期分裂倍数。第一分裂峰值细胞数除以 2，第二分裂峰除以 4，第三分裂峰除以 8 等。

某些情况下进行上述计算会导致荧光峰值与分裂代数不完全匹配。可以用第一分裂峰值作为参考值重新计算进行修正。不分裂细胞进入第一次分裂期时会丢掉部分摄入的 CFSE。这一现象在某些细胞类型中更加明显。图 2.9.1 中人外周血淋巴细胞对植物血凝素的反应是很好的例子。请注意未增殖细胞的平均荧光强度是 763，大于第一分裂峰值的 2 倍。其余峰值之间都接近倍数关系。



标记 (M)	左界值	右界值	几何均数	%	增殖倍数 (i)	子代细胞数 $2i$	前体细胞数	每代细胞百分比/%
1	437	9646	763.13	18.10	0	1	18.10	70.73
2	220	437	310.07	4.24	1	2	2.12	8.28
3	111	220	153.92	5.66	2	4	1.415	5.53
4	58.29	111	77.57	11.80	3	8	1.475	5.76
5	29.43	58.29	40.89	23.47	4	16	1.467	5.73
6	16.55	29.43	22.44	26.22	5	32	0.819	3.20
7	9.31	16.55	13.53	12.05	6	64	0.188	0.73
8	1	9.31	7.63	0.74	7	128	0.006	0.02

图 2.9.1　1×10^6 个细胞/ml 外周血单个核细胞在含 5%胎牛血清和 5μmol/L CFSE 的 PBS 中孵育 5min 后，在 5μmol/L 植物血凝素中培养 4d。图中右侧位于 7.6×10^2 荧光强度单位的空心尖峰表示 CFSE 标记后未加刺激的对照细胞。左侧位于 2×10^0 荧光强度单位的空心尖峰表示未标记细胞的自发荧光。图中显示经计算所得的标记位置：M1（未分裂）、M2（分裂 1 次）、M3（分裂 2 次）、M4（分裂 3 次）、M5（分裂 4 次）、M6（分裂 5 次）和 M7（分裂 6 次）。

9b. 用前体细胞数确定细胞是否出现较多死亡（死细胞会保留 CFSE）。通过比较第 1 代到第 7 代和第 0 代到第 7 代前体细胞百分比估计前体细胞频率（在淋巴细胞群体中对某种抗原或有丝分裂原有反应性的细胞的比例）。

图 2.9.1 所示实验中，29.63%的细胞进入分裂周期。采用分裂代数体现前体

细胞频率的局限性在于，只能在分裂细胞荧光强度与未刺激细胞的自发荧光重叠之前进行分析。

参考文献：Hasbold and Hodgkin，2000；Lyons，1999；Lyons and Parish，1994；

撰 稿 人：Christopher R. Parish and Hilary S. Warren

单元 2.10　细胞毒性 T 淋巴细胞的诱导及检测

本单元介绍几种诱导细胞毒性 T 淋巴细胞并检测其活性的实验方案（图 2.10.1）。请记住，原则上任何种类的细胞都可以用来作为检测 CTL 活性的靶细胞，但最好的靶细胞是淋巴母细胞、组织培养细胞或者肿瘤细胞等活化细胞。

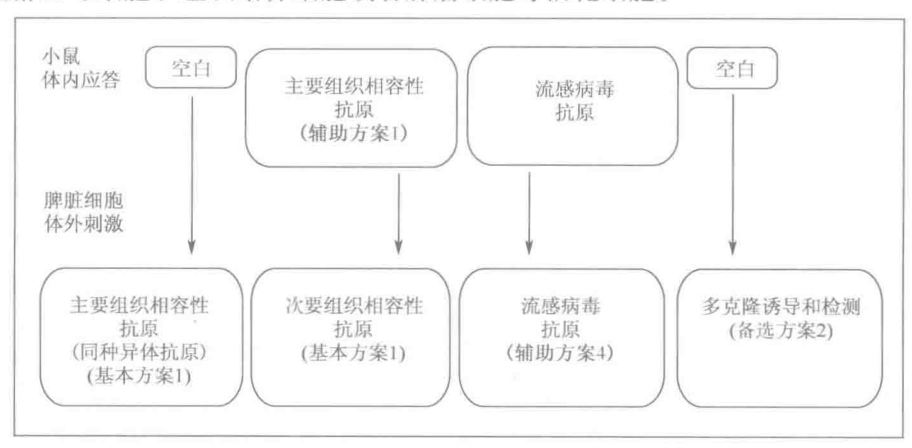


图 2.10.1　细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）的诱导和活性检测。图示本单元各实验方案之间的联系。

基本方案 1　从 CTL 前体中诱导细胞毒性

注意：反应细胞应根据抗原的种类选择是否需要进行体内致敏。

材料（带√项目见附录 1）

反应细胞来源：未致敏的或者体内致敏的小鼠脾脏细胞（见辅助方案 1 和 2）

√致敏培养基

刺激细胞来源：未修饰或半抗原修饰的小鼠脾脏细胞（见辅助方案 3）

√RPMI-10 完全培养基

HBSS 溶解的 0.5mg/ml 丝裂霉素 C（避光保存）

刀豆蛋白 A（选用）：以 α-甲基-D-甘露糖苷中和后加上清至培养细胞中

IL-2（选用）

带有旋盖的 15ml 一次性聚苯乙烯圆锥管（如 Falcon）

24 孔平底微量滴定板，2ml 容积，带盖子（如 Costar）

注：实验小鼠应避免影响实验结果的感染，如 mycoplasma 和免疫抑制性病毒（如

Sendai 病毒）等。

1. 在一个 15ml 圆锥管中，用致敏培养基混悬反应细胞至约 1×10^7 个细胞/ml。如进行初始的滴定实验（步骤 6），在 10ml 培养基中制备 10×10^7 个反应细胞。如检测对 MHC 抗原或半抗原（TNP）修饰刺激细胞的反应，从未致敏小鼠中制备反应细胞（见辅助方案 1 或 2）。
2. 在一个 15ml 圆锥管中，用 RPMI-10 完全培养基混悬刺激细胞至约 1×10^7 个细胞/ml（单元 2.1）。如进行初始的滴定实验（步骤 6），在 5ml 培养基中制备 5×10^7 个刺激细胞。必要时去除红细胞（单元 2.1；这不是严格必需的）。研究对主要和次要组织相容性抗原（如 H-Y 抗原）的反应，用与反应细胞表达不同组织相容性抗原的小鼠品系的正常脾脏细胞作为刺激细胞。对其他抗原的应答，应采用与反应细胞同型脾脏细胞，加入适当的抗原后作为刺激细胞（见辅助方案 3 或 4）。

用丝裂霉素 C 抑制细胞分裂时

3a. 向刺激细胞上清中加入 0.5mg/ml 的丝裂霉素 C 使终浓度达到 25μg/ml。在 37℃饱和湿度，5% CO_2 培养箱中孵育 20min（或在 37℃拧紧盖子的管中避光放置）。

4a. 向装有刺激细胞的管中加满 RPMI-10 完全培养基，室温，200*g* 离心 5min。弃上清并在同样的离心条件下用 14ml 培养基洗 3 遍，得到成团的刺激细胞。洗涤过程主要用于避免携带丝裂霉素 C。为提高效率，可逐渐向下吸出上清直至到达细胞团块。

用 γ 射线照射抑制细胞分裂时

3b. 用 2000rad（$1\text{rad}=10^{-2}\text{Gy}$）γ 射线处理刺激细胞（肿瘤细胞可能需要的剂量 >10 000rad；单元 2.1）。

4b. 向装有刺激细胞的管中加满 RPMI-10 完全培养基，室温，200*g* 离心 5min。弃上清。为提高效率，可逐渐向下吸出上清直至到达细胞团块。

5. 必要时采用同位素标记的胸腺嘧啶摄入法评价辐射或丝裂霉素 C 抑制分裂的效果（单元 2.11）。
6. 用致敏培养基调节细胞浓度，反应细胞为 $2\times10^6\sim10\times10^6$ 个细胞/ml，刺激细胞为 $1\times10^6\sim6\times10^6$ 个细胞/ml（两种细胞都要滴定）。对于一个典型的预实验，应包括三种反应细胞浓度（8×10^6、4×10^6、2×10^6 个细胞/ml）和三种刺激细胞浓度（1×10^6、2×10^6、4×10^6 个细胞/ml）的排列组合。
7. 在 24 孔板的每个孔内加入反应细胞和刺激细胞各 1ml。准备足够的复孔以产生所需的效应细胞（如预实验中每一个反应细胞和刺激细胞浓度组合设 6 孔）。在 2ml 体积中细胞总浓度（反应细胞和刺激细胞浓度相加）不要超过 12×10^6 个细胞/ml。必要时可调整反应体积至 0.2ml（用微量滴定板）或 10ml（使用 25cm^2 平皿）。
8. 备选：如需要，加入约 10%（*V/V*）ConA 上清（经滴定后采用最佳浓度以产生最大 CTL 活性和最小 NK 样活性）或约 10U/ml 重组 IL-2（可以不需要 Th 等辅助细胞；单元 5.1）来提高 CTL 活性。
9. 将细胞在 37℃饱和湿度，5% CO_2 培养箱中培养 5d。拧松盖子以保持气体交换。

10. 按如下方法收集不贴壁细胞（反应细胞的回收率为 50%～100%）。用 5ml 或 10ml 一次性移液管将细胞转移至另一个 15ml 圆锥底管中，室温，200g 离心 5min，随后用 RPMI-10 完全培养基混悬细胞至 1×10^6～5×10^6 个细胞/ml，将盖子拧紧。室温放置（至少可保存 4h）或冰上保存直到用 ^{51}Cr 释放法（见基本方案 2）或 DNA 降解法（见备选方案 1）检测 CTL 活性。

基本方案 2　铬释放法分析 CTL 活性

材料（带√项目见附录 1）

靶细胞，如脾脏淋巴母细胞（按上述方法活化）的单细胞悬液、适当 MHC 表型的组织培养细胞或者肿瘤细胞，如 P815（$H\text{-}2^d$）、EL4（$H\text{-}2^b$）、LK（$H\text{-}2^k$），可从 ATCC 获得

对照靶细胞（除抗原表达外与靶细胞相同的细胞）

√RPMI-10 完全培养基（无需抗生素）

√致敏培养基

有丝分裂原溶液（选用；用于制备脾脏淋巴母细胞）：1mg/ml ConA 的 PBS 溶液，或 1mg/ml LPS 的水溶液（分别用来刺激脾脏 T 细胞和 B 细胞）

约 1mCi/ml $Na_2^{51}CrO_4$ 的等渗溶液，灭菌并且不含致热原（200～500μCi/μg；DuPont NEN 或 Amersham）

胎牛血清（FBS）：56℃热灭活 1h

效应细胞（包括 CTL；见基本方案 1）

对照效应细胞（未致敏的脾脏细胞或无关抗原致敏的脾脏细胞）

2%（V/V）Triton X-100 水溶液

$25cm^2$ 组织培养平皿（如 Corning）

24 孔平底微量滴定板，2ml 容积，带盖子（如 Costar）

尼龙滤网，122μm 孔径（选用；Tetco）

带有旋盖的 15ml 一次性聚苯乙烯圆锥管（如 Falcon）

多通道上清收集系统（Skatron）

96 孔带盖圆底微量滴定板，适用于上清收集系统（Costar）

多通道移液器（50～200μl），带一次性枪头

^{51}Cr 计数管（Skatron）

警告： 操作 ^{51}Cr 试剂和 ^{51}Cr 标记细胞时应遵守标准放射安全操作规范。

1. 用 RPMI-10 完全培养基制备靶细胞的单细胞悬液（单元 2.1）。如采用脾脏淋巴母细胞，将约 5×10^6 个/ml 脾脏细胞（体外）加入约 2μg/ml ConA 或者约 10μg/ml LPS（均用致敏培养基稀释）分别用来刺激 T 细胞和 B 细胞。将脾脏细胞在 $25cm^2$ 直立组织培养瓶（≤10ml 细胞）或 2ml 平底微滴定板（2ml/孔）中，37℃饱和湿度，5% CO_2 培养箱中培养 2～3d。用同样方法制备阳性和阴性对照细胞（每次实验必须）。

另一种在第 0 天收集脾脏细胞作为刺激细胞（见基本方案 1，步骤 2），2～3d 后

收集脾脏细胞作为靶细胞的方法如下。在第 0 天同时收集作为刺激细胞和靶细胞的脾脏细胞。将靶细胞放在培养瓶中拧紧盖子 4℃保存；2～3d 后按步骤 1 中方法加入有丝分裂原，拧松瓶盖后放 CO_2 培养箱中培养 2～3d。

2. 将细胞转移至 15ml 圆锥管中，加入 14ml RPMI-10 完全培养基，室温，约 200*g* 离心 5min 洗一遍。弃上清。
3. 用 5ml RPMI-10 完全培养基混悬细胞。放置数分钟使细胞团块沉淀或用单层 112μm 尼龙滤网放置在 15ml 圆锥管敞开的管口，过滤细胞悬液（用移液器枪头压下滤网形成小的漏斗；如难以形成漏斗则改用 50ml 圆锥管）。
4. 用台盼蓝拒染法确定未沉淀细胞或滤过细胞中活细胞数（附录 3C；实验所需活细胞比例为＞80％）。必要时采用 Ficoll-Hypaque 密度离心（单元 2.1）纯化活细胞，但要注意，从活细胞比例低的群体中纯化的活细胞通常比从比例高的群体中纯化的活细胞更容易发生 ^{51}Cr 渗漏。
5. 在一个 15ml 圆锥管中离心≤5×10^6 个细胞，室温，200*g* 离心 5min。丢弃大部分上清，留下细胞团块上约 0.1ml 的上清。
6. 用留下的 RPMI-10 完全培养基轻轻混悬细胞。加入 0.2ml［少量即可（如 0.05～0.1ml)］约 1mCi/ml ^{51}Cr 溶液（标记肿瘤细胞和培养细胞时＜200μCi/μl 即可）和 20μl FBS。轻轻混匀，将培养瓶盖拧松放 37℃，5％ CO_2 培养箱孵育，淋巴细胞孵育约 45min，肿瘤细胞孵育 1～2h，孵育期间轻轻混匀细胞可提高标记效果。利用孵育时间进行步骤 7 操作。
7. 按步骤 2～4 制备效应细胞，用 RPMI-10 完全培养基混悬至 10^7 个细胞/ml。制备与效应细胞仅存抗原特异性不同的对照细胞（未致敏细胞或无关抗原致敏细胞）。每种效应细胞用 RPMI-10 完全培养基进行 3 倍梯度稀释。
8. 将 0.1ml 效应细胞（CTL 或非裂解性细胞）或对照细胞加至 96 孔板中，每个效应细胞浓度设 3 或 4 复孔。用预期的 CTL 活性计算不同的效应细胞浓度，如效靶比(E∶T)100、20、10、3（通常活化的 CTL 在 E∶T＜1∶1 时即可检测到细胞裂解）。注意，细胞浓度大于 2×10^6 个细胞/孔通常会抑制活性。
9. 按步骤 2 的方法加入 14ml RPMI-10 完全培养基洗涤 ^{51}Cr 标记细胞 2 或 3 遍，将上清全部吸出并收集到装放射性废物的容器中（离心中应盖上管盖）。用 RPMI-10 完全培养基混悬标记的靶细胞至 10^4～10^6 个细胞/ml。迅速进行步骤 10 操作。
10. 将 0.1ml 步骤 7 制备的 ^{51}Cr 标记细胞（即足以产生高于背景≥1000cpm 的细胞数）至装有如下一种细胞的各个孔中，使终体积达到 0.2ml/孔：

    0.1ml 效应细胞（洗后尽快加入靶细胞）

    0.1ml 对照淋巴细胞（步骤 8 注解）

    0.1ml 培养基（检测自发 ^{51}Cr 释放）
11. 为促进效靶细胞间的接触，用培养板架将培养板在约 200*g* 离心约 30s。37℃饱和湿度，5％ CO_2 培养箱中孵育 3～6h（取决于实验目的、效应细胞活力，以及靶细胞 ^{51}Cr 释放的敏感性；也可以培养过夜）（室温结合，37℃裂解）。
12. 将培养板在约 200*g* 离心 5min。将 0.1ml Triton X-100（裂解剂）加入装有 0.1ml 靶细胞的几个孔中，用移液器混匀后检测可释放的最大 ^{51}Cr。用多通道移液器每孔

收集 0.1ml 上清至^{51}Cr 计数管中（挂壁液体可忽略），或者用上清收集系统收集全部上清。

13. 用 γ 液闪仪对^{51}Cr 进行计数，每个样品 1～2min，或加入闪烁液用 β 液闪仪进行计数。
14. 计算每一效应细胞浓度的校正裂解百分比，采用各复孔 cpm 的均数：

$$校正裂解百分比\% = 100 \times \frac{实验组^{51}Cr释放-对照组^{51}Cr释放}{最大^{51}Cr释放-对照组^{51}Cr释放}$$

实验组代表具有 CTL 活性的效应细胞，对照组代表非裂解细胞（材料部分称之为“对照效应细胞”；对照组释放也称为“自发释放”）或者无细胞的培养基。有时将 γ 闪烁计数仪背景计数称为对照^{51}Cr 释放。

15. 用裂解单位、图表或裂解值表述 CTL 数据。将自发^{51}Cr 释放的范围或上限以裂解值百分比的标准误表示。

体内预激产生 CTL 前体

体外用非 MHC 编码抗原产生 CTL 效应细胞的方法，来源于对该抗原体内应答扩增抗原反应性 T 细胞。虽然不同抗原所需的免疫途径和抗原剂量有所不同，但本方案基本适用于大多数实验。

辅助方案 1　次要组织相容性抗原的小鼠体内应答

为在体内产生针对次要组织相容性抗原的应答，应采用与供者小鼠品系相同 H-2 并且同性的小鼠作为受者。为产生抗 H-Y 反应（次要抗原的一个特例），采用雌性受者和同品系雄性小鼠的皮肤或细胞。

向受者小鼠移植皮肤或腹腔注射 1×10^7～5×10^7 个脾脏细胞（在 0.1～0.5ml 体积内；附录 2E），与单元 1.2 中的方法制备的弗氏完全佐剂形成乳浊液。用无血清培养基稀释细胞注射小鼠。在某些品系之间，可能需要在 10～14d 后再次注射 10^7 个脾脏细胞以产生强烈的体外再次应答。在通过适当途径进行体内免疫后，按诱导 CTL（见基本方案 1）的方法制备脾脏单细胞悬液。对于再次应答，提供反应细胞的小鼠通常在最短 1 周最长 1 年的时间内进行过体内免疫。

辅助方案 2　病毒抗原体内免疫小鼠

将流感病毒尿囊储存液用 1.0ml PBS 稀释至 300 血凝素单位（HA U）。按附录 2E 的方法进行腹腔注射。采用适当的途径进行体内免疫后，收集细胞，按诱导 CTL（见基本方案 1）的方法制备脾脏单细胞悬液。

抗原修饰刺激细胞和靶细胞

在^{51}Cr 释放实验中最好用活化细胞作为靶细胞，而正常脾脏细胞可用来刺激产生 CTL（这样可以避免耗时的活化步骤。）

辅助方案 3　TNP 修饰靶/刺激细胞

材料（带√项目见附录 1）

√Hanks 平衡盐溶液（HBSS），无蛋白质

TNBS 溶液

10%热灭活（56℃ 1h）FBS 以 PBS 稀释（PBS 见附录 1），冰冷的

1. 在 15ml 圆锥管中，用 14ml 无蛋白质的 HBSS 洗涤＜10^8 个靶细胞或正常脾脏细胞一遍，室温，200g 离心 5min。弃上清。
2. 用 0.1～0.5ml HBSS 在 15ml 圆锥管中混悬细胞。加入 0.5～0.1ml TNBS 溶液，轻轻混匀，盖上管盖置 37℃水浴 10～15min。水浴过程中轻摇细胞 1 或 2 次。
3. 将 TNP 修饰的细胞用 15ml 冷的等渗 PBS 稀释的 10%FBS 洗 3 遍（第 1 遍洗液是黄色的，第 2 遍、第 3 遍变得清澈）以结合未反应的半抗原（按步骤 1 进行）。
4. 进行产生 CTL 的操作或^{51}Cr 标记（见基本方案 1 和 2）。

辅助方案 4　病毒感染靶/刺激细胞

材料（其他材料见基本方案 2；带√项目见附录 1）

病毒易感的靶细胞（如有丝分裂原活化的 T 淋巴母细胞对流感病毒易感）

每毫升 1000～3000 血凝素单位（HA U）流感病毒的尿囊液（－70℃保存）

√RPMI-10 完全培养基

警告： 虽然该病毒主要适于在鸡胚中生存，但操作活病毒时仍须遵守标准的安全规范。

1. 采用病毒易感的靶细胞，如有丝分裂原活化的 T 淋巴母细胞对流感病毒易感（见基本方案 2，步骤 1）。
2. 将含 100HA U 的流感病毒尿囊储存液用 RPMI-10 完全培养基稀释至 0.5ml。

3a. ^{51}Cr 释放实验：标记步骤开始时将 0.5ml 病毒稀释液加到 10^7 个靶细胞的细胞团块上（见基本方案 2，步骤 6），混悬细胞，加入 0.2ml ^{51}Cr 储存液。按基本方案 2 操作（在^{51}Cr 标记前进行感染或标记后孵育 4h 可提高敏感性）。

3b. 产生对病毒修饰的同系细胞的反应：加入一份体积病毒（200HA U/ml）至一份体积的 2×10^7 个刺激细胞/ml（均用致敏培养基稀释），按^{51}Cr 释放实验的步骤 1～5 进行操作（见基本方案 2）。

不考虑抗原特异性的总 CTL 活性评价

下面的方案通过采用有丝分裂原刺激 CTL 前体的方法绕过 MHC 限制性和 CTL 前体的抗原特异性。

备选方案 1　多克隆 CTL 活性的诱导

在 24 孔微滴定板中用含有 2μg/ml ConA 的致敏培养基培养反应脾脏细胞

($5\times10^6\sim10\times10^6$ 个细胞/ml)5d。收集效应细胞（见基本方案 1，步骤 8），在细胞的 RPMI-10 完全培养基（附录 1）悬液中加入 0.1mol/L α 甲基-D-甘露糖苷（αMM）。分析 CTL 活性（见基本方案 2，步骤 8～15）。

备选方案 2　CTL 再定向杀伤活性的检测

按基本方案 1 中步骤 1～8 获得效应 CTL 细胞，检测其杀伤活性（见基本方案 2），但不是通过加入表达相关抗原的细胞，而是加入纯化的 PHA（终浓度 1μg/ml；Burroughs Wellcome）或 Con A（终浓度 5μg/ml；Pharmacia Biotech 或 Miles Lab）到效应 CTL 和 ^{51}Cr 标记的靶细胞的混悬液中（步骤 10）。也可加入少量凝集素，如 20μl。注意，任何一种结合凝集素的靶细胞均可用于检测凝集素再定向的 CTL 活性；但肿瘤细胞（如 EL-4 或 P815）比淋巴母细胞更敏感。

参考文献：Henkart and Yue，1988；Young *et al*.，1988

撰 稿 人：John Wunderlich and Gene Shearer

单元 2.11　T 淋巴细胞增殖实验

本单元主要介绍小鼠 T 淋巴细胞增殖实验。小鼠 B 淋巴细胞增殖实验已在单元 2.7 中进行介绍。人外周血淋巴细胞增殖实验将在单元 8.7 中叙述。

注：如无特别说明，文中所有培养均在 37℃，5% CO_2 培养箱中进行。接触细胞的所有溶液及器械必须无菌，并且采用相应适当的灭菌技术。

基本方案 1　未致敏 T 淋巴细胞的活化

多种试剂可诱导未致敏 T 淋巴细胞增殖，这些试剂包括药物、抗 CD3/TCR 或者抗 Thy-1 单克隆抗体、肠毒素和凝集素。表 2.11.1 列出本方案中所用试剂的品种和使用浓度。当比较不同细胞群体的反应性时，由于每种细胞群体对不同的细胞数目可能产生不同的反应，因而需要对反应细胞及用于反应细胞和刺激细胞（MLR 中）的活化试剂做剂量-反应检测。

表 2.11.1　增殖检测中用于激活未致敏 T 细胞的试剂

试剂[a]	来源[b]	浓度	辅助细胞[c]	活化方式
PMA	SIG	1～10ng/ml	no	离子霉素或 A23187；药物
离子霉素	CAL	200～500ng/ml	no	PMA；药物
A23187	CAL	100～500ng/ml	no	PMA；药物
PHA	WD	1～5μg/ml	yes	间接 TCR 交联
ConA	PH	1～10μg/ml	yes	间接 TCR 交联
Anti-Thy-1	PG mAB-G7	1～50μg/ml	yes[c]	间接 TCR 交联
Anti-CD3	PG HM-CD3	0.1～5μg/ml	yes[c]	板包被或溶液；间接 TCR 交联
Anti-TCR-αβ	PG HM-AB-GD-TCR	0.1～10μg/ml	yes[c]	板包被或溶液；间接 TCR 交联
Anti-TCR-γδ	PG HM-AB-GD-TCR-1；HM-GD-TCR-3	0.1～100μg/ml	no	板包被；直接 TCR 交联

续表

试剂[a]	来源[b]	浓度	辅助细胞[c]	活化方式
Anti-V8.1，8.2[c]	PG MM-Vβ-TCR-1	0.1～100μg/ml	no	板包被；直接 TCR 交联
Anti-Vβ-6[c]	PG RM-Vβ-TCR-2	0.1～100μg/ml	no	板包被；直接 TCR 交联
Anti-Vβ-11	PG RM-Vβ-TCR-3	0.1～100μg/ml	no	板包被；直接 TCR 交联
StapH tox A	TT	1～10μg/ml	yes[c]	Vβ-1，3，10，11，17 受体特异性
StapH tox B	TT；SIG	1～100μg/ml	yes[c]	Vβ-3，7，8，7 受体特异性
StapH tox E	TT	1～10μg/ml	yes[c]	Vβ-11，15，17 受体特异性

a. 缩写：PMA，phorbol 12-myristate 13-acetate 佛波酯；PHA，phytohemagglutinin 植物血凝素；Con A，concanavalin A 刀豆蛋白 A；Staph tox A，B&E，Staphyloccus enterotoxins A，B &E，葡萄状球菌肠毒素 A，B，E。

b. 缩写：CAL，Calbiochem；PG，Pharmingen；PH，Pharmacia LKB；SIG，Sigma；TT，Toxin Technology；WD，Wellcome Diagnostics。

c. 当使用抗 CD3/TCR 可溶性抗体时（尤其是平底板），辅助细胞是必需的。当使用葡萄状球菌肠毒素时，辅助细胞必须表达正确的 MHC II 类分子。当使用抗 Thy-1 抗体时，辅助细胞视具体情况可用可不用。

材料（带√项目见附录）

√RPMI-5 和 RPMI-10 完全培养基

反应细胞：未免疫小鼠胸腺、脾脏或淋巴结来源的淋巴细胞（单元 2.1）或纯化的 T 淋巴细胞或 T 淋巴细胞亚群（单元 2.1 和单元 2.2）

活化试剂（表 2.11.1）

√ PBS

辅助细胞：经射线照射或用丝裂霉素 C 处理过的（见辅助方案 2）或 T 细胞剔除的（见辅助方案 1）小鼠脾脏细胞悬液

^{3}H TdR（附录 3E）

15ml 和 4ml 聚苯乙烯锥底离心管

带 Sorvall H-1000B 转子的低速离心机（或相当于此型的离心机）

1ml、5ml、10ml 一次性聚苯乙烯吸管

带盖 96 孔平底或圆底培养板（Coster）

25～100μl 单道或多道移液器和一次性枪头

1. 按照单元 2.1 所述，用 RPMI-5 完全培养基制备来源于小鼠胸腺、脾脏或淋巴结的反应细胞悬液，收集的细胞数量应保证后续实验所需（每种器官的细胞数量见单元 2.1）。
2. 用 15ml 离心管室温，200g 离心单细胞悬液 10min，弃上清。
3. 用 RPMI-5 完全培养基重悬细胞团块，计数并用 RPMI-10 完全培养基调整细胞约为 10^{6} 个细胞/ml（可参比预实验中每孔 2×10^{5}、4×10^{5} 和 8×10^{5} 个细胞的结果调节细胞浓度），如果用高度纯化的 T 细胞或 T 细胞亚群作为反应细胞，需根据激活剂的不同（表 2.11.1）加入相应的非 T 辅助细胞（如 0.1×10^{5}、0.5×10^{5} 或 1×10^{5} 个细胞/0.1ml 同型脾细胞，加入到 2×10^{5} 个细胞/0.1ml 的 T 细胞中，见辅助方案 1）。如果比较不同细胞群体的反应性，需对活化剂和反应细胞进行滴定并做动力学实验。
4. 按以下方法于室温在 4ml 的离心管中配制工作浓度的活化剂。单克隆抗体（如果来

自上清或腹水，至少使用四种稀释度）、毒素（确认使用的小鼠表达能够结合毒素的MHC II 分子）或凝集素：用 PBS 将 1mg/ml 储存液进行四种稀释度，如 100μg/ml、30μg/ml、10μg/ml 和 3μg/ml，由于蛋白质会结合到塑料上，因此稀释后应马上使用。对于药物，用 PBS 配制成合适浓度即可，如 PMA，100ng/ml；A23187，1μg/ml（或 4μg/ml 离子霉素）。

5. 加入 20μl 各种不同稀释度的活化剂（单抗、肠毒素或凝集素）至 96 孔平底或圆底板中，设置 3 个复孔，如每种激活剂用一行。对照孔加入 20μl PBS。由于 PMA 和 A23187 的剂量-反应曲线很窄，所以只需用一个浓度，即加入第 4 步中给出浓度的 20μl PMA 或钙离子载体。
6. 在含有活化剂的 96 孔板中加入 2×10^5 个细胞/0.2ml。
7. 将 96 孔板置 37℃，5%CO_2 的培养箱中培养 2～4d（依经验决定培养时间）。
8. 每孔加入^{3}H TdR，然后置 CO_2 培养箱中继续培养 18～24h，用半自动样品收集器收集样品，并用 β 液闪仪检测 cpm 值。

9a. Δcpm 值（大部分文献推荐）：用实验组（刺激组）三个复孔的 cpm 平均值减去对照组（未加刺激剂组）三个复孔的平均值，得出实验组的 Δcpm 值。

9b. 实验组和对照组 cpm 的比值：实验组 cpm 的平均值除以相应对照组的 cpm 平均值（结果表示为刺激指数或 SI）。

注：本底的微小变化将引起 SI 值的很大变化，在分析结果时应特别注意。

备选方案 1 用抗体激活未致敏的 T 细胞

这种方法适用于当抗 CD3/TCR 复合物抗体不能有效结合小鼠辅助细胞上的 Fc 受体，或其可溶形式不能有效活化 T 细胞时。值得注意的是，在某种抗体（如抗 G7、Thy-1 单克隆抗体）很难诱导 T 细胞增殖反应的情况下，推荐采用基本方案 1。

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录）

√PBS（室温和 4℃）

用 PBS 配制 1mg/ml 纯化的抗 CD3 或抗 TCR 单克隆抗体（非特异性活化 T 细胞）或 1mg/ml 纯化的抗 Vβ 或抗 TCR-γδ 单克隆抗体（特异性激活 T 细胞，表 2.11.1）。

1. 在 4ml 聚苯乙烯圆锥底离心管中，用无菌室温 PBS（不含蛋白质）将 1mg/ml 无菌的单克隆抗体储存液（表 2.11.1），根据实验需要配制 4 个浓度的工作液：如 100μg/ml、10μg/ml、1μg/ml、0.1μg/ml，临用前配制。
2. 加 30μl 各浓度的抗体工作液（每孔最多结合 2～3μg；最佳浓度通常为 10μg/ml）至 96 孔圆底板中（每种单抗使用一行），用 30μl PBS 作为对照孔。
3. 盖好板盖，轻拍培养板侧面确保液体完全覆盖孔底。37℃培养 90min，或者 4℃培养过夜。培养的同时进行下一步操作。
4. 同基本方案 1 中的步骤 1～3，制备反应细胞悬液（可高度纯化，但其中的辅助细胞并不影响实验结果）。
5. 每孔加入 200μl 预冷的 PBS 洗涤上述抗体包被的培养板孔，在超净台中将培养板反

转倒扣于吸水纸上轻拍，除去残余的液体，重复洗涤 2 或 3 次，确保除去多余的抗体。

6. 在洗好的板中加入准备好的细胞悬液 2×10^5 个细胞/（0.2ml·孔）（根据经验来确定，不能用杂交瘤上清）。如果细胞暂时未准备好，可加 100μl PBS 后置 4℃保存过夜（加细胞前应去掉 PBS）。
7. 按基本方案 1 中的步骤 7～9 进行，在培养 2～3d 后（进行动力学实验确定最佳时间）加入^{3}H TdR。

备选方案 2　混合淋巴细胞增殖实验

附加材料（其他材料见基本方案 1）

反应细胞：未免疫小鼠胸腺、脾或淋巴结的淋巴细胞（附录 2H 和单元 2.1）或者纯化的 T 淋巴细胞或 T 淋巴细胞亚群（单元 2.1 和单元 2.2）。

刺激细胞：与反应细胞在 H-2 或 Mls 位点不同的同种异体小鼠脾细胞，经照射或用丝裂霉素 C 处理（见辅助方案 2）或剔除 T 细胞（见辅助方案 1）。照射或用丝裂霉素 C 处理可阻断 T 细胞摄取^{3}H TdR。

1. 按照基本方案 1 中步骤 1～3 准备反应细胞。一般来说，需分别稀释成每孔 0.5×10^5、1×10^5、2×10^5 和 4×10^5 个细胞，各浓度设置 3 个复孔（通常后两个细胞浓度孔可产生最佳的增殖反应），若使用胸腺细胞，需更多的细胞数量（如每孔 1×10^5、2×10^5、4×10^5 和 8×10^5 个细胞）。
2. 每孔加 0.55×10^5～4×10^5 个细胞/0.1ml 反应细胞至 96 孔板，如需要，每个实验组设置 3 个复孔。
3. 制备经照射灭活或用丝裂霉素 C 处理的刺激细胞悬液，或者 T 细胞剔除后的刺激细胞悬液。根据经验来确定刺激细胞的最佳浓度（如每孔 2×10^5、4×10^5、9×10^5 个细胞），每孔加 0.1ml 细胞悬液至含有反应细胞的孔中。对照组包括：反应细胞与经照射或用丝裂霉素 C 处理的与反应细胞同基因小鼠来源的刺激细胞的共培养复孔（本底值）、单独的刺激细胞和单独的反应细胞。
4. 参照基本方案 1 中步骤 7～8 进行，但需培养 3～6d（根据经验确定培养时间）。

辅助方案 1　从抗原呈递细胞或刺激细胞悬液中剔除 T 淋巴细胞

这一方法的主要目的是排除辅助 T 细胞的影响。纯化和富集抗原呈递细胞的方法见相关章节；单元 2.3 中介绍的方法未剔除 T 细胞，因此不推荐使用。

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录）

与反应 T 细胞同基因的未免疫小鼠脾细胞

√HBSS

低毒兔补体（Cedarlane），用冰冷无菌的去离子水稀释

抗 Thy-1.2 单抗（HO-13-4，ATCC no. TIB99）或抗 Thy-1.1 单抗（HO-22-1，ATCC no. TIB100；或其他抗-Thy-1 单克隆抗体见 CPIM 表 3.4.1 和腹水制

备见单元 1.4）

√70% Percoll 溶液（单元 2.5）

1. 离心、沉淀脾细胞悬液。
2. 弃上清，在沉淀中加入 0.9ml HBSS，0.1ml 补体和 25μl 抗 Thy-1 单抗，混合后置 37℃水浴 45min。
3. 室温，200*g* 离心 10min，弃上清。用 HBSS 重悬沉淀，并洗涤 2 遍以上，计数活细胞（附录 3C），加入 RPMI-10 完全培养基或 PBS，按照辅助方案 2 灭活细胞，或用 HBSS 悬浮细胞制备低密度辅助细胞（见下面）。如果需要，可分离该群细胞以提高辅助细胞的功能（步骤 4～5）。
4. 用 23.58ml 70% Percoll 与 6.42ml HBSS 混合配制 55%的 Percoll 液，用 HBSS 悬浮步骤 3 中剔除 T 细胞后的脾细胞，调整细胞浓度为 20×10^6 个细胞/ml。在 15ml 锥底离心管中，将 3ml 细胞悬液叠加至 3ml 55% Percoll 的液面上，室温，1900*g* 离心 13min。
5. 用巴氏吸管移出 Percoll/HBSS 界面层细胞，用 HBSS 洗涤 3 遍。记数活细胞数，用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞并根据辅助方案 2 灭活细胞。

辅助方案 2　辅助/刺激细胞的灭活

注：当需要检测 *Mls* 基因编码的抗原性差异或没有辐射射源时，多数研究者优先采用丝裂霉素 C 灭活细胞。

丝裂霉素 C 灭活细胞

附加材料（其他材料见基本方案 1）

丝裂霉素 C（Sigma，避光保存）

1. 在铝箔包裹的 15ml 试管中，用 PBS 配制浓度为 0.5mg/ml 的丝裂霉素 C 溶液，并过滤除菌。临用前新鲜配制。
2. 按照基本方案 1 中步骤 1 和 2，用 PBS 制备 5×10^7 个细胞/ml 脾细胞悬液。
3. 加入丝裂霉素 C 至终浓度为 50μg/ml，并用铝箔包裹试管，置 37℃室温 20min。
4. 加入过量的 RPMI-5 完全培养基（大约 12ml 可以加满试管），300*g* 离心 10min。弃上清，并重复洗 2 遍以上。
5. 用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞，计数细胞，调整细胞至需要的浓度（见基本方案 1，步骤 6）。

照射灭活细胞

按照基本方案 1 中的步骤 1～3，用 RPMI-10 完全培养基制备脾细胞悬液，终浓度为 5×10^6～20×10^6 个细胞/ml。用辐射源（^{60}Co 或^{173}Cs γ-辐射器，如 Gammacel 1000、Nordion）1000～2000rad 照射灭活细胞。

这一辐射范围适用于大多数免疫学实验中脾细胞的灭活。然而，不同脾脏细胞照射后，其抗原呈递能力有所不同（Ashwell *et al*.，1984）：低辐射时（500～1000rad），B

细胞维持抗原呈递功能；1100～2000rad 辐射后，抗原呈递能力大幅度下降；>2000rad 灭活的 B 细胞失去 APC 功能。而另一方面，巨噬细胞和树突细胞在 3000rad 照射后依然保持抗原呈递的功能。为确保 B 细胞不参与应答，一些研究者倾向于采用 2000rad。然而，在检测刺激细胞 Mls 位点抗原时，应采用<1000rad 的辐射，因为此时 B 细胞能够更为有效地呈递 Mls 抗原。另外，Mls 应答也可在丝裂霉素 C 处理后进行检测，处理后的 B 细胞依然保持抗原呈递的功能。

在转化的细胞株用作抗原呈递或辅助细胞时，需使用高强度的照射从而阻断其增殖。每种细胞株适合的辐射强度需要根据预实验来确定，但至少应达 5000rad；某些转化的细胞株可能需要高达 10 000～20 000rad，或有些细胞株可能对丝裂霉素 C 更为敏感。

基本方案 2　致敏 T 细胞的活化

为了使免疫动物在体外对可溶性抗原或肽产生再次免疫应答，可采用弗氏完全佐剂乳化可溶性抗原（单元 1.3）；为了使引流淋巴结产生更强的免疫应答，可在动物后足垫进行免疫；为了使脾脏产生强的免疫应答，可在动物腹腔进行免疫。基于尾部免疫也可作为有效的免疫途径；为使动物对细胞性抗原产生应答，应在腹腔内注射 1×10^7～5×10^7 个表达此种抗原的细胞，免疫方法详见附录 2E。

体内致敏后 2～3 周内，体外常规检测致敏 T 细胞的应答。这一检测同样适用于后续的体外克隆（单元 2.13）和 T 细胞杂交瘤的制备（单元 2.12）。

材料（带√项目见附录）

√RPMI-5 和 RPMI-10 完全培养基

反应细胞：从体内致敏的小鼠淋巴结（单元 2.1 和单元 2.2）分离纯化的 T 细胞

抗原：1mg/ml 灭菌的蛋白质抗原（单元 2.12），溶于 PBS 或溶于 RPMI-10 完全培养基的经辐射或丝裂霉素 C 处理表达异型抗原的刺激细胞，8×10^6 个细胞/ml（单元 2.10 辅助方案）

辅助细胞：经辐射或用丝裂霉素 C 处理的（或剔除 T 细胞的）与反应 T 细胞同基因的脾细胞悬液 5×10^6 个细胞/ml，悬于 RPMI-10 完全培养基（见辅助方案 1）

4ml 的锥底离心管

带盖 96 孔平底培养板

1. 按照基本方案 1 中的步骤 1～3，准备反应细胞。
2. 在 4ml 的锥底离心管中，用 RPMI-10 完全培养基配制 4 个不同稀释浓度的抗原（如 100μg/ml、10μg/ml、1μg/ml、0.1μg/ml 的抗原和 8×10^6、4×10^6、2×10^6、1×10^6 个细胞/ml 的刺激细胞）。按 30μl/孔（蛋白性抗原）或 100μl/孔（细胞性抗原）将抗原加到 96 孔板。每个实验组设 3 个复孔，包括只加培养基不加抗原的对照组。
3. 加反应 T 细胞 0.1ml/孔，如果使用致敏小鼠的淋巴结细胞，则每孔加 1×10^5～2×10^5 个细胞直接进行基本方案 1 中的步骤 6。如果使用蛋白质抗原特异性的纯化的淋巴结 T 细胞，每孔加入 5×10^5（0.1ml）个与反应细胞同基因型的辅助脾细胞。
4. 以下实验同基本方案 1 中的步骤 7～9，可通过动力学实验确定培养时间（应答通常

在第 4 天或第 5 天达到高峰)。

基本方案 3　$CD4^+CD25^+$T 细胞的活化和抑制功能的检测

材料（带√项目见附录）

$CD4^+CD25^-$和 $CD4^+CD25^+$T 细胞（单元 2.2）
√RPMI-10 完全培养基
辅助细胞：T 细胞剔除的经辐射灭活的脾细胞悬液（单元 2.2，辅助方案 1）
纯化的抗 CD3 抗体（BD PHarmingen）
小鼠或人 IL-2（PeproTech 或 Roche）
纯化的抗 CD28 抗体（BD PHarmingen）
^{3}H TdR
带盖 96 孔平底培养板
37℃，5%CO_2 的培养箱
半自动样品收集器
β液闪仪

1. 按单元 2.2 所述，用 RPMI-10 完全培养基分别配制 $CD4^+CD25^-$ 和 $CD4^+CD25^+$ T 细胞悬液，计数并调整 $CD4^+CD25^-$ 和 $CD4^+CD25^+$ T 细胞浓度分别为 1×10^6 个细胞/ml。
2. 按辅助方案 1 或单元 2.2 所述，用 RPMI-10 完全培养基准备辅助细胞，计数并调整细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml。
3. 用 RPMI-10 完全培养基配制以下抗体：抗 CD3，1μg/ml；IL-2，200 U/ml；抗 CD28，2μg/ml。
4. 每孔加 $CD4^+CD25^-$T 细胞 50μl 至 96 孔平底板中，共 9 孔。或每孔加 $CD4^+CD25^+$ T 细胞 50μl，共 9 孔。
5. 每孔分别加 50μl 辅助细胞和 50μl 浓度为 1μg/ml 抗 CD3 抗体。
6. 在其中 3 孔 $CD25^-$ 和 3 孔 $CD25^+$ 细胞中，分别加 50μl 浓度为 200 U/ml 的 IL-2。
7. 在另外 3 孔 $CD25^-$ 和 3 孔 $CD25^+$ 细胞中，分别加 50μl 抗 CD28，每组的剩余 3 孔加 50μl 的 RPMI-10 完全培养基。
8. 在 96 孔板中每孔加入 50μl $CD4^+CD25^+$ T 细胞，做 3 或 4 个两倍系列稀释 $CD4^+CD25^+$ T 细胞，包括仅含 50μl 完全培养基的对照孔。每个稀释度设 3 个复孔。
9. 在步骤 8 的各孔中每孔加 50μl $CD4^+CD25^-$ 细胞、50μl 辅助细胞和 50μl 浓度为 1μg/ml 的抗 CD3。
10. 将培养板置 37℃，5%～7%CO_2 的培养箱中培养 3d（约 66h）。
11. 第 3 天，每孔加^{3}H TdR，继续培养 6～8h，用样品收集器收集细胞，并用β液闪仪测量 cpm 值。

备选方案 3　$CD4^+CD25^+$T 细胞抑制功能的两步法检测：短期活化和扩增 $CD4^+CD25^+$T 细胞并分析其抑制功能

附加材料（其他材料见基本方案 3，带√项目见附录）

√PBS

从 TCR 转基因小鼠中分离、纯化的 $CD4^+$T 细胞

与转基因 TCR 对应的蛋白肽

带盖 24 孔平底培养板

1. 按单元 2.2 所述，用含有 100U/ml IL-2 的 RPMI-10 完全培养基纯化 $CD4^+CD25^+$T 细胞，计数并用含 IL-2 的完全培养基调整细胞浓度至 1×10^6 个细胞/ml。
2. 用 PBS 配制 5μg/ml 抗 CD3 抗体。在 24 孔板每孔中加入 300μl 抗体溶液。根据预期 $CD4^+CD25^+$T 细胞收获量来估计抗体包被孔的数目。在 37℃，5%～7% CO_2 的培养箱中培养 90min。
3. 吸弃板中的抗体，并用 PBS 洗 2 遍以除去残余的抗体。
4. 加入 1ml（1×10^6 个）$CD4^+CD25^+$T 细胞。在 37℃，5%～7% CO_2 的培养箱培养 3d，使细胞完全活化但尚未大量扩增。
5. 3d 后，用含 100U/ml IL-2 的 RPMI 完全培养基将细胞按 1∶3 或 1∶4 传代，后重置于 37℃，5%～7% CO_2 的培养箱培养，3～4d 内使用，否则，每隔 3～4d，用含 100U/ml IL-2 的 RPMI 完全培养基传代。
6. 剧烈吹打收集活化的 $CD4^+CD25^+$T 细胞。4℃，200*g* 离心 10min，洗涤 2 次彻底除去残留的 IL-2，并用 RPMI 完全培养基重悬 $CD4^+CD25^+$T 细胞，调整细胞浓度至 1×10^6 个细胞/ml。
7. 按基本方案 3 中的步骤 8～11，检测 $CD4^+CD25^+$T 细胞的抑制功能，这些细胞在抗 CD3 的存在下可被重新活化。
8. 根据单元 2.2 用 RPMI-10 完全培养基制备 TCR 转基因小鼠的 $CD4^+$T 细胞悬液。计数并调整 $CD4^+$ 细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml。
9. 按辅助方案 1 或单元 2.2 所述，用 RPMI-10 完全培养基制备辅助细胞，计数并调整细胞浓度为 1×10^6 个细胞/ml。
10. 用 RPMI-10 完全培养基，制备 4 倍最佳终浓度的抗原溶液。在实验前预先滴定抗原的浓度，使用能产生 60 000～120 000cpm 的抗原剂量。
11. 在 96 孔板的 3 个孔中加入 50μl $CD4^+CD25^+$T 细胞。做 3 或 4 个 2 倍稀释的 $CD4^+CD25^+$T 细胞。对照孔只加入 50μl RPMI-10 完全培养基。
12. 每孔加 50μl TCR 转基因的 $CD4^+$ 细胞、50μl 的辅助细胞和 50μl 的抗原。
13. 按基本方案 3 中的步骤 10 和 11 进行。

参考文献：Corradin *et al.*，1997

撰 稿 人：Ada M. Kruisbeek，Ethan Shevach，and Angela M. Thornton

单元 2.12　T 细胞克隆的建立

本单元提供了建立特异性 T 细胞克隆的方法。注意该方法成功的关键是选择和制备条件培养基。

注：如无特殊说明，细胞均在 37℃，5%CO_2 条件下培养，且所有和细胞接触的溶液和仪器必须依照严格的无菌技术消毒。

基本方案 1　产生和维持同种反应性 Th 和 CTL 克隆

尽管同种反应性 T 细胞可以从未刺激的脾细胞或淋巴结细胞中产生，但如果细胞在初次混合淋巴细胞（MLC）中第一次被同种抗原刺激，反应细胞的得率会更高。见以下介绍。

材料（带√项目见附录）

同种反应性小鼠脾脏 T 细胞
√HBSS（可选使用）
√DMEM-20 完全培养基
经照射的（2000rad，单元 2.11）同种异基因型小鼠脾脏 T 细胞
生长因子：MLC 或 Con A 刺激的细胞上清（见辅助方案 1 或 2），重组细胞因子
96 孔平底培养板（Costar）
24 孔细胞培养板（Linbro，Costar）

1. 在体外用同种异型抗原致敏同种反应性 T 细胞 10～14d（见辅助方案 2，步骤 1），最好使用 HBSS 或 DMEM 溶液（即与小鼠血清等渗的溶液）。
2. 准备再次刺激用的 MLC（见辅助方案 2，步骤 3），培养 36～48h。
3. 将经照射（2000rad）的同种异型脾 T 细胞，用 DMEM-20 培养基调节细胞浓度为 10^7 个细胞/ml，每孔 100μl 加入到 96 孔平底板中。
4. 从再次刺激用的 MLC 体系中收集 T 细胞（步骤 2），重悬于 DMEM-20 中并计数（附录 3A）。
5. 将重悬的 T 细胞用 MLC 或 ConA（作为细胞因子）激活的上清稀释到 1～10 个细胞/ml，50μl 每孔加入步骤 3 的 96 孔板中，37℃培养 4d。
6. 在每孔中加入 50μl MLC 激活的上清和 50μl DMEM-10 培养基。培养 7 ～10d 直到在倒置显微镜下可在一些孔中观察到有明显的细胞集落形成。

7a. 用 ^{51}Cr 微量释放实验检测细胞毒活性：用 ^{51}Cr 微量释放实验检测细胞毒活性（Engers and Fitch；单元 2.10），区分同种反应性 CTL 和 Th 细胞。如果细胞毒活性试验显示阴性，进一步用单元 2.11 所示的增殖试验检测 Th 细胞的存在。

7b. 检测 IL-2 或 IL-4 的产生：用抗原（单元 5.1）再次刺激检测 IL-2 或 IL-4 的产生，或用表面表达 CD4 或 CD8（单元 4.1 和单元 4.2）筛选。

8. 鉴定同种反应性 T 细胞克隆是否具有应有的特征（特异的细胞毒活性和特异性细胞

因子的产生)。

9. 按如下方法维持克隆的细胞:从原来的 96 孔板转移 100μl 细胞悬液(含 2.5×10^4～1×10^5 个细胞)到 0.9ml 含 6×10^6 个经照射的同种异型脾细胞和 0.5ml MLC 激活的上清的 24 孔细胞培养板,补加 DMEM-20 培养基使终体积达每孔 1.5ml。每隔一周按此种方法传代细胞。

基本方案 2　用可溶性蛋白抗原诱导 Th 克隆

不要臆断 TCR 转基因小鼠是单克隆性的,因为它们会含有内源性 TCR 基因重排的细胞。

材料(带√项目见附录 1)

免疫用小鼠
蛋白质抗原
√DPBS
完全弗氏佐剂
√DMEM-5 完全培养基
用 DMEM-5 完全培养基培养的经照射(2000rad,单元 2.11)的同基因型的脾细胞
生长因子:MLC 或 Con A 激活的上清(见辅助方案 1 或 2);或重组淋巴因子,如人重组 IL-2(hrIL-2;如 Chiron Therapeutics)和小鼠重组 IFN-γ(mrIFN-γ;如 Genentech)
96 孔平底板(Costar)
24 孔细胞培养板(最好是 Linbro 的,也可用 Costar)

注:在加入培养之前,所有的试剂和细胞都用 DMEM-5 完全培养基制备。

1. 抗原用 Dulbecco 氏 PBS 和完全弗氏佐剂溶解,在小鼠后足足垫和尾巴基底部用 1∶1 抗原乳状液皮下注射小鼠,每个模型需建立抗原剂量(如 100μg/ml～1mg/ml)和反应细胞数量梯度。
2. 7d 后,取腋下、腹股沟和肠系膜的引流淋巴结,用适合的缓冲液(单元 2.1)制备单细胞悬液,最好选用与小鼠血清等渗的缓冲液(如 HBSS、DMEM)。
3. 在 24 孔板培养体系中同时加入 2×10^6 个淋巴结细胞和 6×10^6 个照射灭活的同基因型的脾细胞,加上抗原培养 6～8d,补充 DMEM-5 完全培养基至 1.5ml。如果需要,加入外源性的 rIL-12(10～20U/ml)以利于 Th1 型细胞的诱导,或加入 rIL-4(200～1000U/ml)以利于 Th2 型细胞的诱导。继续步骤 4a～6a 产生 Th1 型细胞克隆,或步骤 4b～6b 产生 Th2 型细胞克隆。

产生 Th1 克隆

4a. 准备 96 孔平底板(也可用圆底的,但圆底的不易观察),每孔加入:
50μl 用 DMEM-5 完全培养基制备的经照射灭活的同基因型的脾细胞(2×10^7 个细胞/ml);

50μl 用 DMEM-5 完全培养基溶解的抗原 200～1600μg/ml；

25μl 180U/ml hrIL-2 和 25μl 4000U/ml mrIFN-γ，或 100μl MLC 激活的上清。

5a. 用 DMEM-5 完全培养基重悬需要克隆的 T 细胞，细胞浓度≤2000 个细胞/ml（设定 T 细胞数量梯度），取 50μl 加入到步骤 4 的 96 孔板中。当使用 MLC 激活的上清时（步骤 4a），用 MLC 激活的上清重悬需要克隆的 T 细胞，每孔加入 100μl，37℃培养 7d。

6a. 每孔中加入 25μl 80U/ml hrIL-2 和 25μl 4000U/ml mrIFN-γ（或 100μl MLC 激活的上清）。继续培养 7d 直到阳性孔的底部（即显微镜下可观察到单细胞群簇生长）几乎铺满细胞。

产生 Th2 克隆

4b. 准备 96 孔平底板，每孔中加入：

50μl 用 DMEM-5 完全培养基制备的经照射的同基因型的脾细胞（2×10^7 个细胞/ml）；

50μl 用 DMEM-5 完全培养基溶解的抗原（200～1600μg/ml）；

50μl 40U/ml hrIL-2 或 50μl Con A 激活的上清（40%）。

某些 Th2 型细胞（Greenbaum *et al.*，1988）的生长需要 IL-1。经照射的脾细胞可以提供 IL-1，但外源性的 IL-1 还是必需的。外源性的 rIL-4（200～1000U/ml）或抗 IFN-γ 单克隆抗体（R46A2，1∶8 杂交瘤培养上清）同样可以促进 Th2 细胞克隆的产生。

5b. 用 DMEM-5 完全培养基重悬需要克隆 T 细胞，细胞浓度≤2000 个细胞/ml（设定 T 细胞数量梯度），取 50μl 加入到步骤 4b 的 96 孔板中，37℃培养 7d。

6b. 加入 50μl 40 U/ml hrIL-2 或 50μl Con A 激活的上清（终浓度为 10%）。继续培养 7d 直到阳性孔底部（即显微镜下可观察到单细胞群簇生长）铺满细胞。

7. 在 24 孔细胞培养板中加入以下试剂和细胞，调整终体积至每孔 1.5ml：

100μl 用 DMEM-5 完全培养基制备的 5×10^4～2×10^5 个克隆细胞；

0.9ml 用 DMEM-5 完全培养基悬浮的 6×10^6 个经照射的同基因型的脾细胞；

50～400μg/ml 抗原；

Th1 型细胞克隆：MLC 激活的上清（终浓度 33%）或 hrIL-2（终浓度 25U/ml）和 mrIFN-γ（终浓度 250U/ml）；

Th2 型细胞克隆：Con A 激活的上清（终浓度 10%）或 hrIL-2（终浓度 25U/ml）。

当最初从克隆板中建立维持培养体系时，最好将整个孔转移而无需计数（用于 T 细胞起始克隆的 IL-2 浓度需高于维持培养时）。长期培养时，hrIL-2 的终浓度为 10U/ml。如有需要，采用显微操控的方法（见辅助方案 4）重新克隆 T 细胞以确保其克隆形成能力。

8. 培养细胞，用步骤 7 所述的方法每隔 7～10d 传代细胞。

在进行 Th2 克隆传代时最好不要加生长因子。在没有抗原和 Con A 激活的上清的条件下培养 4d 传代，然后与经照射灭活的同基因脾细胞静息培养 10d，实验表明在这样条件下产生的 T 细胞克隆更有利于辅助 B 细胞抗体生成（Kimoto and Fath-

man，1982)。

9. 一旦获得足够数量的细胞，通过检测 IL-2、IL-4 和 IFN-γ 的产生（单元 5.1）鉴定新产生的克隆。

生长因子来源的条件培养基的制备

在选择一种条件培养基之前必须考虑的一个重要因素是，每种培养基包含不同的细胞因子谱。

辅助方案 1　制备刀豆蛋白 A 活化的上清（Con A 上清）

刀豆蛋白 A 活化的上清（Con A 上清）富含 IL-2，几乎不含 IL-4 和 IFN-γ。关于此试剂的具体用法见基本方案 2。

材料（带√项目见附录 1）

新鲜制备的大鼠或小鼠的脾细胞（单元 2.1）
√DMEM-5 完全培养基，不含 MOPS
刀豆蛋白 A
CTLL-2 或 HT-2 小鼠细胞株（ATCC）
25cm² 细胞培养瓶
Sorvall 离心机和 H-1000B 转子（或相当的）

1. 用 DMEM-5 完全培养基（不含 MOPS）以 1.25×10^6 个细胞/ml 在 25cm² 细胞培养瓶中培养大鼠或小鼠的脾细胞，加 2.5μg/ml 刀豆蛋白 A。
2. 室温，800*g* 离心 10min，收集培养上清。
3. 用 CTLL-2 或 HT-2 小鼠细胞检测刀豆蛋白 A 刺激上清中 IL-2 的含量（单元 5.1）。−70℃分装保存。
4. 因为上清中残留的刀豆蛋白 A 可能会影响反应性 T 细胞克隆发挥效应，可用 0.2g/ml的葡聚糖凝胶黏合剂将之吸收去除。

辅助方案 2　制备混合淋巴细胞培养上清（MLC 上清）

与刀豆蛋白 A 活化上清不同，来自混合淋巴细胞反应体系的培养上清，除了含有 IL-2 外，还含有高水平的 IFN-γ。

材料（带√项目见附录 1）

C57BL/6 反应性小鼠脾细胞（单元 2.1）
照射灭活的（2000rad）DBA/2 刺激的小鼠脾细胞
√DMEM-5 完全培养基
CTLL-2 或 HT-2 小鼠细胞株（ATCC）
50ml 塑料细胞培养瓶
50ml 聚丙烯圆锥底离心管
Sorvall 离心机和 H-1000B 转子（或相当的）

1. 在50ml塑料细胞培养瓶中按如下方法建立初次混合淋巴细胞反应体系：将 2.5×10^7 个C57BL/6反应性小鼠脾细胞与等量照射灭活的DBA/2刺激的小鼠脾细胞混合于20ml DMEM-5完全培养基中，培养10～14d。
2. 收集初级混合淋巴细胞反应体系细胞至50ml聚丙烯圆锥底离心管中，室温，200*g* 离心10min，弃上清，再用20ml DMEM完全培养基洗1遍。
3. 用与初次淋巴细胞反应体系相同的条件，制备再次淋巴细胞反应体系，将 6×10^6 个初次淋巴细胞反应体系细胞和 2.5×10^7 个经照射的用于刺激DBA/2小鼠脾细胞混合于20ml DMEM-5完全培养基中，37℃培养36h。
4. 收集培养上清，室温，800*g* 离心10min，弃细胞。
5. 用CTLL-2或HT-2小鼠细胞检测MLC激活上清中IL-2的含量（单元5.1）。－70℃分装储存。

辅助方案3　制备PMA激活的EL-4淋巴瘤细胞上清（EL-4上清）

因为不需要脾细胞，PMA激活的EL-4肿瘤细胞上清的制备非常方便。EL-4上清中含IL-2而不含IFN-γ，一些细胞系还分泌IL-4。因此，EL-4上清可代替基本方案2中Con A上清。然而，使用EL-4上清更利于哪种类型的 T_H 细胞克隆尚不清楚。

材料（带√项目见附录1）

EL-4 IL-2淋巴瘤细胞（ATCC＃TIB181）
√DMEM-10完全培养基
PMA
活性炭（可选择的）
CTLL-2或HT-2小鼠细胞系（ATCC）
$25cm^2$ 组织培养瓶
50ml聚丙烯圆锥底离心管
Sorvall离心机和H-1000B转子（或相当的）

1. 在 $25cm^2$ 组织培养瓶中，用含20ng/ml PMA的DMEM-10完全培养基培养EL-4 IL-2淋巴瘤细胞（10^6 个细胞/ml）4h。
2. 收集细胞，室温，200*g* 离心10min，洗3遍，重悬细胞于DMEM-10完全培养基，37℃培养36h。或者再用活性炭吸附去除上清中所含的PMA（Farrar *et al*.，1980）。
3. 收集培养上清，用CTLL-2或HT-2小鼠细胞检测上清中IL-2的含量（单元5.1）。－70℃分装储存。
4. 在制备大量上清之前应在预实验中检测细胞的反应性。

辅助方案4　用显微操作的方法克隆

与有限稀释法比较，更推荐使用重复显微操作的方法培养克隆，它是确保克隆形成能力的唯一方法。

附加材料（其他材料见基本方案2）

微毛细管（如微量血细胞比容管，Becton Dickinson）

组织培养喷灯

小孔径橡胶或塑料管

60mm×15mm 组织培养板（Becton Dickinson Labware）

1a. 获取与可溶性抗原反应的克隆：准备 96 孔平底板，在加入 T 细胞前，先加入 0.2ml 体系的适于 T 细胞克隆形成所需的抗原、经照射的同基因型的脾细胞和生长因子（见基本方案 2，步骤 4a 或 4b）。

1b. 获取同种异体反应性克隆：准备 96 孔平底板，加入用 0.1ml DMEM-20 完全培养基悬浮的 10^6 个经照射的脾细胞（见基本方案 1，步骤 3）。

2. 将微毛细管在组织培养喷灯火焰上加热，牵拉制备合适孔径的吸管，插入一定长度的小孔径橡胶或塑料管。

3. 挑选一个单细胞，用橡胶或塑料吸管通过吸嘴轻轻的吸入玻璃管。将细胞转移到另一块培养板上，加入 DMEM-10 完全培养基，反复吸吹几次，确保单细胞被转移。

4. 转移分离的细胞至含有合适的细胞、抗原和生长因子的微孔中（步骤 1），37℃培养 10 ～14d。

5. 检测阳性孔中细胞的相关特性，如溶细胞活性（单元 2.10），细胞因子的分泌（单元 5.1 和单元 5.12）或增殖（单元 2.11）。

6. 维持 T 细胞克隆（见基本方案 1，步骤 10 或基本方案 2，步骤 8）。

参考文献：Fathman and Fitch，1982

撰 稿 人：Frank W. Fitch and Thomas F. Gajewski

单元 2.13 制备小鼠 T 细胞杂交瘤

可通过将活化的 T 细胞和肿瘤细胞融合获得 T 细胞杂交瘤。异质性的杂交瘤可以通过有限稀释法克隆获得表达特异性 T 细胞受体（TCR）的杂交瘤。杂交瘤可以在缺乏生长因子的条件下大量的扩增。研究证明，杂交瘤对研究 TCR 特异性识别抗原以及 CD3-TCR 复合物的生物化学和分子生物学是非常有用的。

注：如无特殊说明，细胞均在 37℃，5%CO_2 条件下培养，且所有和细胞接触的溶液和仪器必须依照严格的无菌技术消毒。

基本方案 细胞融合和 T 细胞杂交瘤的选择

材料（带√项目见附录 1）

小鼠（用于体内可溶性蛋白或蛋白肽致敏 T 细胞的制备）

完全弗氏佐剂

反应细胞（未致敏的淋巴结 T 细胞）和用于再次混合淋巴细胞反应中激活 T 细胞用的刺激细胞（表达所需同种异型抗原的脾细胞）

BW5147 淋巴瘤细胞系（ATCC＃TIB48，全名为 BW5147.G.4.1，药物标记，在 HAT 培养基中死亡，对 6-硫鸟嘌呤抵抗）

√DMEM-10 和 DMEM-10 完全培养基
可溶性蛋白抗原和抗原呈递细胞（单元 2.11）
√ 2×HAT 平面培养基
洗涤培养基：不含 FBS 或 HEPES 的 DMEM
含 50%（*m*/*V*）PEG 溶液
1mol/L HCl 或 NaOH（可选使用）
小鼠胸腺细胞（与反应性 T 细胞同基因，单元 2.1）
10^{-4}mol/L 6-硫鸟嘌呤（Sigma，可选择的）
√新鲜制备的 1×HT 平面培养基
25cm²、75cm²、175cm² 组织培养瓶
400ml 和 600ml 烧杯
计时器
生物安全柜
4ml 和 50ml 聚丙烯圆锥底离心管
带 Sorvall H-1000B 转子（或相当的）的低速室温离心机
1ml、2ml、10ml 和 25 ml 吸管
96 和 24 孔细胞培养板

1a. 获得能与可溶性抗原反应的 T 细胞：融合前两周，用完全弗氏佐剂乳化待测抗原后免疫 3 或 4 只小鼠（单元 2.11 和单元 2.12）。

1b. 获得能与同种异型抗原反应的 T 细胞：融合前两周，用未致敏的淋巴结 T 细胞作为反应细胞，用表达同种异型抗原的脾细胞作为刺激细胞，激发初次混合淋巴细胞反应（单元 2.11 和单元 2.12）。

2. 融合前一周，在 37℃用 DMEM-10 完全培养基培养扩增 BW5147 细胞，确保到细胞融合当天有≥1×10^8 个对数生长期的淋巴瘤细胞可用。当细胞浓度达到 1×10^6 个细胞/ml 时，将 BW5147 细胞转移到新鲜的培养基中。在这一周中不要让细胞过度生长，不要让培养基过酸（颜色变黄）。为达到最佳结果，在融合当天细胞活力应接近 100%（≥95%），并且要避免支原体的污染（附录 3F）。

3a. 对于淋巴结 T 细胞：融合前 3d，用合适的抗原和抗原递呈细胞体外刺激抗原致敏的小鼠来源的淋巴结 T 细胞（单元 2.11 和单元 2.12）。

3b. 对于同种反应性 T 细胞：融合前 3d，再次刺激来源于初次混合淋巴细胞反应体系的同种反应性 T 细胞（单元 2.12）。

4. 融合前一天，用新鲜的 DMEM-10 完全培养基将 BW5147 淋巴瘤细胞按 1∶5 比例传代（3 个 175cm² 组织培养瓶，每瓶含 100ml 1×10^5～2×10^5 个细胞/ml 以期在融合当天收获≥1×10^8 个细胞）。

5. 准备 2×HAT 培养基、DMEM-20 完全培养基和含 50%PEG 溶液。用 50ml 离心管分装 2×HAT 培养基和 DMEM-20 完全培养基（每种 3 管），用 4ml 离心管分装 2ml PEG 溶液。

6. 融合当天，37℃水浴预热以下容器和试剂：

　　分别装有 75ml 水的 3 个 400ml 和 3 个 600ml 烧杯；

分装于 4 个 50ml 离心管的中 200ml 无菌洗涤培养基；

2ml 分装于 4ml 离心管的 50％PEG 溶液；

50ml 分装于 50ml 离心管无菌的 DMEM-20 完全培养基。

7. 设置离心机的温度到室温，并在层流净化柜中放置一个计时器。
8. 准备胸腺细胞悬液用于步骤 20 中融合细胞的铺板（单元 2.1），用 50ml DMEM-20 完全培养基调整细胞浓度为 5×10^6～10×10^6 个细胞/ml（此体积正好用于 5 块平板的实验）。
9. 从培养体系中收集活化的 T 细胞，用 Ficoll-Hypaque 离心去除死细胞（单元 2.1）。用洗涤培养基洗最后一遍。
10. 在收集 T 细胞的过程中，同时收集 BW5147 细胞并用 Sorvall H-1000B 转子室温，200*g* 离心洗涤。
11. 在层流净化柜中装配 3 个 37℃水浴装置，将一个 400ml 盛有 37℃水的烧杯置于 600ml 盛有 37℃水的烧杯中（来自步骤 6）。在每个水浴中，放置一个装满洗涤培养基的 50ml 离心管，一个装满 DMEM-20 完全培养基的 50ml 离心管和一个装有 2ml 50％PEG 溶液的 4ml 离心管。如果 PEG 溶液偏碱性（显示紫色），加适量 1mol/L HCl 中和，如果偏酸性（显示黄色）则加适量 1mol/L NaOH 中和。
12. 计数 T 细胞和 BW5147 细胞并检测细胞活力（只有接近 100％时才能使用）。将装有细胞的离心管置于层流净化柜中的水浴中。再将装有胸腺细胞的离心管放入水浴。
13. 将 BW5147 细胞和活化的 T 细胞以 1：1 的比例在 50ml 聚丙烯圆锥底离心管中混合，加 20ml 37℃的洗涤培养基。当第一次用特别批次的 BW5147 细胞做融合时，推荐做比例梯度，BW5147 细胞：T 细胞从 1：10、1：3 到 1：1。
14. 室温，800*g* 离心 5min。
15. 用连于真空烧瓶的无菌吸管吸去上清，并将离心管置于其中一个水浴中。
16. 用 1ml 的吸管将 1ml 预热的 50％PEG 洗涤培养基逐滴加入到沉淀的混合细胞中，从第一滴开始计时，每次加一滴，1min 内加完，每一滴后用吸管末端轻柔地混匀细胞，每次都需不断地搅拌。本步骤及步骤 17 和 18 的操作，应避免破坏易碎细胞。
17. 用 2ml 的吸管将 2ml 预热的洗液逐滴加入到 PEG/混合细胞中，2～3min 内加完，每一滴后轻柔混匀细胞（以获得小团细胞聚集物）。
18. 用 10ml 的吸管将 7ml 预热的洗涤培养基逐滴加入到前一步骤所得的溶液中，每次加一滴，2min 内加完，继续用吸管末端轻柔混匀细胞。
19. 室温，800*g* 离心 5min。
20. 用 10ml 的吸管将 10ml 胸腺细胞悬液（来自步骤 8）用力加到细胞团块上。
21. 搅拌的同时继续加入剩余的胸腺细胞，直到达到所需的体积（每个培养皿 10ml，步骤 8 和 13），避免用力吹打。
22. 保持 10ml 吸管（不要用自动移液器）成 45°角，用另一只手的手指固定住吸管末端使之位于 96 孔平底板孔上方 1cm，各孔加入两滴（约 0.1ml）细胞悬液。
23. 将每块培养板用锡箔包裹（可选使用），置于 37℃，7.5％CO_2 培养箱中。

24. 培养 1d 后，用 10ml 吸管每孔加入两滴 2×HAT 培养基，每块培养板用不同的吸管，不能将每块培养板的盖子混淆。将培养板重新置于培养箱。
25. 融合后第 3 天，当非融合细胞死亡而融合细胞尚未生长起来时，将细胞置于倒置显微镜下观察。如果没有观察到大量细胞死亡，检查这批 HAT 的有效性（保存于 4℃，有效性会选择性降低）。或者，选择一株新的生长于 10^{-4} mol/L 6-硫鸟嘌呤的 BW5147 细胞。
26. 在第 6～7 天，当杂交瘤细胞可见时，用无菌吸管吸弃每孔一半液体。每孔加入两滴新鲜融化的 2×HAT 培养基。如果液体变黄，应在倒置显微镜下观察，确证不是由污染引起，则开始扩增。
27. 从第 6～7 天开始，每天检查培养板中细胞是否需要扩增，即孔底细胞是否覆盖 50%。扩增液体轻微变黄的孔，用 1ml 吸管转移细胞到 24 孔板中。每孔加入 1ml 1×HT 培养基。
28. 扩增后的 1～2d，室温补充 1ml 1×HT 培养基。
29. 当 24 孔板中的细胞生长状态良好，重悬每孔的细胞，吸取 1ml 加入到另一块新的 24 孔板，每孔中补充 1ml DMEM-10 完全培养基，从而复制两块相同的培养板。
30. 步骤 29 之后的 1～2d 内，当孔中的杂交瘤细胞长到 1×10^6～2×10^6 个时，用其中一块培养板进行筛选。在等待筛选结果时观察另一块培养板，根据需要确定是否需要补充培养基，一旦孔中液体变黄，用新鲜的 DMEM-10 完全培养基替换孔内3/4的液体。

辅助方案 1　筛选表达 CD3-TCR 原始杂交瘤

在杂交瘤被转移到 24 孔板后，立即利用一孔进行初筛（如初筛 CD3-TCR 的表达）。被选择的细胞株应该通过有限稀释进行克隆和冻存（单元 1.3，辅助方案）。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

生长中的杂交瘤（见基本方案，步骤 30）

√ 洗涤缓冲液

异硫氰酸荧光素（FITC）的交联的抗鼠 CD3-εMAb（Pharmingen HM-CD3，表 2.11.1）

FITC 的交联的对照 MAb（如 MAb 识别不表达在 T 细胞上的抗原的任何抗体）

4ml 圆底离心管（Falcon 或 Equivalent）

1. 用 2ml 吸管重悬 24 孔板中的一孔，并平均分配至两个 4ml 的圆底管中。
2. 4℃，200g 离心 5min，弃上清，每管中加入 2ml 洗涤缓冲液并再次离心。
3. 在其中一管中加入 FITC 标记的抗 CD3 抗体，另一管中加入 FITC 标记的对照抗体（依经验决定单克隆抗体的饱和量）（单元 4.1 和单元 4.2，通常是 1μg/10^6 个细胞），在冰上孵育 20～30min。
4. 每管中加入 2ml 洗涤缓冲液，离心，弃上清，同步骤 2，重复一次。
5. 每管中加入 0.5ml 洗涤缓冲液，进行流式细胞分析。确认抗 CD3 抗体标记的杂交瘤（如表达 CD3-TCR）用于抗原识别的候选者。

辅助方案 2　筛选抗原特异性的杂交瘤

在辅助方案 1 中，只有一部分 CD3-TCR⁺ 的杂交瘤具有所需的抗原特异性，因此，需要测试候选杂交瘤的抗原特异性，而不是保存（克隆及冻存）所有的 CD3-TCR⁺ 的杂交瘤。

附加材料（其他材料见基本方案）

生长中杂交瘤（见基本方案，步骤 30）

同基因型的脾细胞悬液（与活化 T 细胞供者同系小鼠；用于检测可溶性抗原的特异性）或同种异体小鼠脾细胞悬液，即与 MLC 中刺激细胞供者小鼠同系；用以检测同种异体抗原的特异性（单元 2.1）

可溶性蛋白或多肽抗原

1a. 检测对可溶性蛋白抗原的特异性：对每一种被检测的杂交瘤，将用 DMEM-10 完全培养基培养的同基因型脾细胞悬液 0.1ml（2×10^6 个细胞/ml）加入 96 孔平底板中的 2 孔或 6 孔以检测对可溶性抗原的特异性的杂交瘤（两孔用于杂交瘤本身，两孔用于杂交瘤和脾脏细胞，两孔用于杂交瘤、脾脏和抗原）。

1b. 检测对同种异体抗原的特异性：对每一种被检测的杂交瘤，将用 DMEM-10 完全培养基培养的同种异型脾细胞悬液 0.1ml（2×10^6 个细胞/ml）加入 96 孔平底板中的 4 孔或者 6 孔以检测对同种异体抗原的特异性的杂交瘤性（2 孔用于杂交瘤本身，2 孔用于杂交瘤和同种异体脾脏细胞）。

2. 如检测对可溶性蛋白抗原特异性的杂交瘤，向含有同基因型的脾细胞的两个孔中加入适量抗原。
3. 用 1ml 的吸管在 24 孔板中的一个孔中重悬杂交瘤细胞（见基本方案，步骤 30），分配至 6 孔中，每孔 0.1ml 细胞悬液（$1\times10^6\sim2\times10^6$ 个细胞），用于检测可溶性蛋白特异性的克隆，或分配至 4 孔中，用于检测同种异体抗原特异性的克隆。24 孔板中剩下的细胞，补充 DMEM-10 培养基，进一步培养和监测。
4. 把 96 孔板置于 37℃，培养 18～24h。
5. 从监测板的每孔中吸出 100μl 上清，置于一块新 96 孔板中，作为原监测板的复板。
6. 将该复板放置－20℃冷冻应不少于 1h。如果该板需冷冻保存数天，需用锡箔纸包裹。
7. 将复板解冻后进行 CTL 增殖检测（单元 5.1），以监测孔中 IL-2 和（或）IL-4 的含量。

   对于可溶性抗原特异性的 T 细胞：如果该杂交瘤表达所需的特异性抗原，仅在同时含有抗原、脾细胞和杂交瘤细胞的孔中才能产生细胞因子。对于同种异型抗原特异性 T 细胞：如果该杂交瘤表达所需的特异性抗原，仅在同时含有同种异型刺激细胞和杂交瘤细胞的两孔中才能产生细胞因子。

8. 将所需的杂交瘤细胞通过有限稀释法克隆并冷冻保存（单元 1.3）。

参考文献：Kappler *et al.*，1981

撰 稿 人：Ada M. Kruisbeek

单元 2.14 检测凋亡和其他形式的细胞死亡

基本方案 1 用活细胞或荧光染料定量细胞活性

显微镜观察是一种简单且准确的检测凋亡的方法。凋亡的标志性特征包括细胞核浓缩、细胞膜完整但出现发泡现象，以及清晰的胞质。

材料（带√项目见附录 1）

√染料混合剂
PBS 的细胞悬液（附录 1）
96 孔圆底板
显微镜用的载玻片
1 号厚度的盖玻片或预先包被了聚左旋赖氨酸的盖玻片（用于非贴壁细胞，Sigma）
装有 40 倍或 63 倍的物镜和适当滤光片的荧光显微镜（表 2.14.1）

表 2.14.1 几种荧光显微镜的滤光片

	激发波长/nm	发散波长/nm
窄带波长 FITC	450～490	520～560
罗丹明	510～560	590～700
宽带波长 FITC	450～490	520～700

注：吖啶橙和溴化乙锭具有高度诱导突变的能力，使用时需特别注意。

1. 加 5μl 染液至 96 孔圆底板的孔底。
2. 加 50μl 5×10^5～5×10^6 个细胞/ml 的 PBS 悬液到染液中，轻轻地混匀。淋巴细胞必须用细胞刮从培养瓶底部刮下。
3. 取 10μl 的该混合液放在干净的载玻片上，然后盖上 1 号厚度的盖玻片，对于非贴壁细胞盖上预先包被了聚左旋赖氨酸的盖玻片。
4. 用装有 40 倍或 63 倍的物镜及适当滤光片的荧光显微镜观察玻片。

   通常台盼蓝染色的细胞可见三种明显的形态：①正常的活细胞由于排斥台盼蓝（附录 3C）呈现清晰的白色盘状；②早期凋亡的细胞由于排斥台盼蓝，而呈现不规则的形状（像一团皱褶的纸）或呈现核固缩；③晚期凋亡或坏死的细胞呈现不规则蓝染的细胞碎片。

   吖啶橙染色的细胞，在窄带波长 FITC 的滤波片（520～560nm，表 2.14.1）下呈现绿色，溴化乙锭染色的细胞在罗丹明滤光片下呈现红色；溴化乙锭和吖啶橙的荧光在宽波 FITC 滤光片下可同时被看见。早期凋亡的细胞具有凋亡核的形态，但由于此时细胞仍有完整的细胞膜，所以不被溴化乙锭染色。晚期凋亡和坏死的细胞由于溴化乙锭染色 DNA 和 RNA 而呈广泛的红色。坏死的细胞可通过其核的形态加以区分。分裂间期的细胞为绿色荧光，其荧光密度的改变反映常染色体和异染色体的分布。相对而言，凋亡的胞核在胞核周围呈高度浓缩的月牙状，或整个核呈现一

个或一簇无特征的明亮的圆球。凋亡进一步进展后，细胞会丢失 DNA 或变成像爆米花样的碎片；整体的亮度将低于正常细胞。

5. 计数至少 200 个细胞，根据独特的染色质形态特征记录以下四种细胞状态的细胞数目（除非细胞已经发生程序性细胞死亡一段时间或已经破碎成凋亡小体）：

细胞状态/胞核状态	染色质的颜色，胞核的特征
有活力/正常（VN）	亮绿色，有组织结构
有活力/凋亡（VA）	亮绿色，高度浓缩或破碎
无活力/正常（NVN）	亮橙色，无凋亡核的特征
无活力/凋亡（NVA）	亮橙色，浓缩或破碎

6. 根据下列公式计算凋亡细胞的比例（凋亡指数）和死细胞的比例：

$$\text{凋亡指数}=\frac{VA+NVA}{VN+VA+NVN+NVA}\times 100$$

$$\text{细胞死亡率}=\frac{NVN+NVA}{VN+VA+NVN+NVA}\times 100$$

基本方案 2　DNA 裂解片段的定量

该方法用于研究细胞毒性 T 细胞（CTL，单元 2.10）和自然杀伤细胞（NK 细胞，单元 8.6）介导的凋亡的检测。

材料（其他材料见附录 1）

^{125}I UdR 标记胞核 ^{51}Cr 标记胞质的 T 细胞（见辅助方案 2）
室温和冰冷的完全 RPMI 培养基
未标记的细胞毒性 T 细胞（CTL，单元 2.10；可选使用）
TTE 溶液：TE 缓冲液，pH7.4 含有 0.2%（*V/V*）的 Triton X-100（4℃保存 6 个月以上）
Sorvall RT6000 或相当的台式离心机
Beckman Gamma 500 计数系统

1. 加 100μl 用 RPMI 完全培养基悬浮的浓度为 5×10^4～5×10^5 个细胞/ml T 细胞到 1.5ml 的离心管中，用于胞核和胞质的放射性标记，标记为“B”。
2. 与 100μl 的 RPMI 完全培养基轻柔混匀用于检测自发释放，与 100μl RPMI 完全培养基中 10^4～10^6 个的未标记的 CTL 细胞混合用于实验组释放。
3. 在室温，50*g* 离心 5min 以增加细胞之间接触。根据被检细胞的不同，在 37℃培养1～8h。
4. 向每个离心管中加入 800μl 预冷的 RPMI 完全培养基。室温，200*g* 离心 10min 使细胞和大的团块沉淀。
5. 小心吸取上清，放入标有“S”的管中，并放置一边。
6. 在标记“B”的管中加入 1ml TTE 溶液，并剧烈振荡使细胞团块裂解，以最高速度离心 10min，使 DNA 片段与完整的染色质分离，小心吸取上清，放入标有“T”的管中，在沉淀中加入闪烁液用以计数。
7. 使用 β 液闪仪或 Beckman Gamma 500 的计数仪检测 S、B 和 T 各管中 ^{51}Cr 和 ^{125}I 的

含量（如果使用 Gamma 500 计数仪，^{125}I 放射率＝可变系数活性－^{51}Cr 系数活性）。

8. 用以下公式计数自发组和实验组^{51}Cr 的释放（即裂解）比例：

裂解比例＝$S/(S+T)\times 100$

S 是 S 管中^{51}Cr 的放射性活性（cpm）

$(S+T)$ 是 S 管和 T 管中^{51}Cr 的放射性活性（cpm）。

9. 用以下公式计数自发组和实验组 DNA 片段（即 cpm^{125}I）的比例：

DNA 片段比例＝$(S+T)/(S+T+B)\times 100$

$(S+T)$ 是 S 管和 T 管中未沉淀染色质的^{125}I 的放射性活性（cpm），

$(S+T+B)$ 是 S 管、T 管和 B 管中^{125}I 的放射性活性（cpm）。

10. 用以下公式计算特异性裂解和 DNA 片段的比例

特异性裂解或 DNA 片段的比例＝$(e-s)/(100-s)\times 100$

式中，e 和 s 分别是根据上面的公式计数得到的实验组（与 CTL 共培养）和自发组（单独 RPMI 组；步骤 2）特异性裂解和 DNA 片段的比例。

备选方案　计数放射性标记的 DNA 定量细胞中 DNA 片段

此方法是用于定量检测用放射性^{125}I UdR 或^{3}H TdR 标记的细胞中的 DNA 片段。根据掺入的同位素的量，用此方法可分析至少 1000 个细胞。对于可选的非放射性的替代方法，请查询 http://www.rocheapplied-science.com 中用 ELISA 方法检测细胞死亡。

附加材料（其他材料见基本方案 3）

悬于RPMI 完全培养基（附录 1）的^{125}I UdR 或^{3}H TdR 标记的细胞/ml（见辅助方案 2 或 3）

水溶性的闪烁液

0.1%（m/V）SDS（适用于不能使用微量离心管的 γ 或 β 液闪仪）

γ 液闪仪（适用于^{3}H TdR）

1. 根据实验需要将 DNA 分离成 B、S 和 T 三个部分（见基本方案 3，步骤 1～6），用^{125}I UdR 或^{3}H TdR 标记的细胞替换未标记细胞。
2. 用适当的计数仪检测每部分的放射性活性。如果是^{125}I UdR 标记 DNA 可用 γ 计数仪，如果是^{3}H TdR 标记 DNA，可用 β 液闪仪检测。如果仪器接受微量管（如某些 γ 计数仪）可计数微量管本身，如果仪器不接受微量管（如 β 液闪仪和某些 γ 计数仪），可加入 0.5ml 的 1%SDS 溶解 DNA 并转移到适当的试管中再检测。
3. 计算片段 DNA 的比例（见基本方案 2，步骤 9）。

辅助方案 1　用^{125}I UdR 和^{51}Cr 放射性标记细胞核

材料（带√项目见附录 1）

细胞悬液

√RPMI-10 完全培养基

水溶性 1mCi/ml 碘苷（^{125}I UdR）（约 2000 Ci/mmol；ICN Biomedicals）

RPMI 1640 培养基

17mm×100mm 聚苯乙烯离心管（Falcon）

IEC 式 CRU-5000 离心机（或相当的）

γ 计数仪

1. 标记前一天，准备悬浮生长的传代培养细胞，用 RPMI-10 完全培养基调整细胞浓度为 $1\times10^5\sim4\times10^5$ 个细胞/ml。
2. 将上述细胞悬液转移到 17mm×100mm 聚苯乙烯离心管中，4℃，200*g* 离心 10min 使细胞沉淀。吸弃上清，并加入 200μl RPMI-10 完全培养基，调整细胞浓度为 $1\times10^6\sim4\times10^6$ 个细胞/ml。
3. 加入 2～10μCi 的水溶性 1mCi/ml 碘苷 ^{125}I UdR（2～20μl），37℃培养 90～120min。如果除胞核外胞质也需要标记，则在培养的后 60min 加入 100μCi 的 5mCi/ml ^{51}Cr，使用双标的细胞只要求 ^{125}I∶^{51}Cr>2∶1。
4. 用 10ml 37℃的 RPMI-10 完全培养基，洗涤细胞 3 次，按照基本方案中的需要用 RPMI-10 重悬细胞到适当的浓度备用。
5. 用 γ 液闪仪检测 10 000 个靶细胞的放射性活性以测定掺入量，如掺入量低于 0.5～3cpm ^{125}I/细胞和 0.05～0.5cpm ^{51}Cr /每个细胞，应该检查是否有支原体感染（附录 3F）或用较低的活细胞的初始密度重新实验。

辅助方案 2　用 ^{3}H TdR 放射性标记细胞核

材料（带√项目见附录 1）

待标记的细胞

√RPMI-10 完全培养基

1mCi/ml ^{3}H TdR 水溶液（2.0Ci/mmol，ICN Biomedicals）

RPMI 1640 培养基（Life Technologies），37℃

1. 用 RPMI-10 完全培养基将待标记的培养细胞按浓度为 $1\times10^5\sim4\times10^5$ 个细胞/ml 传代培养。
2. 向处于生长期的细胞中加入 1mCi/ml ^{3}H TdR 使终浓度为 0.5～2mCi/ml，37℃（5%CO_2，可选）培养 12～18h。
3. 用 10ml RPMI 1640 培养基在 37℃下洗涤细胞 3 次，每次 4℃，300*g* 离心 5min。
4. 按基本方案的需求用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞调整到合适的细胞浓度。
5. 用 β 液闪仪检测 10 000 个靶细胞的放射性以确定 ^{3}H 掺入量。如果掺入量低于 0.2～3cpm/细胞，检查是否有支原体污染，或降低阴性对照组的活细胞初始密度重新实验。
6. 可选使用：如果需要，试验结果理想，用两个重复样本的平均值来计算细胞丢失的比例（每个实验点重复样本中活细胞的数目变化不大于 10%～20%）。

参考文献：Lenardo *et al.*，1999；Surh and Sprent，1994

撰 稿 人：Jagan Muppidi，Melissa Porter，and Richard M. Siegel

［郭振红（单元 2.1～2.10）　刘秋燕（单元 2.11～2.14）］

第三章 细胞活化的生物化学

免疫系统中细胞的许多功能都是通过表达细胞表面受体来实现的。这些受体对胞外配体的识别必须转换为适当的生化信号，才能起始并控制细胞的应答，如活化、增殖、成熟以及分泌生物介质（如细胞因子）。某些生化信号在所有的淋巴细胞中都是存在的，但一些精密的胞内信号途径在不同类型的细胞间是有差别的，对一种特异性受体来说，甚至会因与不同配体结合而产生不同的信号（Frank *et al.*，1990）。

已证实，T 细胞（Weiss *et al.*，1986）和 B 细胞（Cambier *et al.*，1987）活化的早期事件涉及胞内钙水平（单元 2.6）的快速改变（数秒钟内）。在同等时间内（30s 内），T 细胞的 TCR 或 B 细胞表面的免疫球蛋白受体与配体的结合可导致磷酸肌醇的快速分解，随后产生至少两种具有活性的生化信使：二酰甘油（DAG）和 1,4,5-三磷酸肌醇[Ins(1,4,5)P_3]。因此，受体介导的磷酸肌醇周转（turnover）的最特异的指标是肌醇磷酸（InsP），尤其是 Ins(1,4,5)P_3 水平的增高。单元 3.1 介绍了 Ins(1,4,5)P_3 水平的检测方法。

蛋白质磷酸化是胞内信号转导的另一个重要的事件。为了得到蛋白质磷酸化位点的详细信息，一种非常有效的检测方法是二维磷酸多肽绘图。单元 3.2 中提供的方法是使用特异性抗体（抗体制备见单元 3.4）检测含有磷酸化酪氨酸残基的蛋白质。

如前所述，许多细胞信号转导途径都利用了蛋白酪氨酸激酶（TPK）。这些不同种类的酶一般以低丰度存在于细胞内，并且经常处于一种非活化状态，这使得传统的生化手段纯化工作很难进行。单元 3.3 介绍了免疫复合物蛋白激酶检测，该方法可以测定特定 TPK 的存在，并且可以通过检测自身磷酸化或外源底物磷酸化的方法来评估激酶的功能状态。TPK 抑制剂经常被用于检测该 TPK 是否参与了某一途径的信号转导。单元 3.5 介绍了固相和免疫复合物试验检测丝裂原活化的蛋白激酶（MAPK）中 JNK 和 ERK 亚家族蛋白的方法。同时也介绍了固相 JNK 蛋白激酶检测当中所需的用于诱导 JNK 和 ERK 基因表达的 T 细胞活化方法以及 GST-cJUN/GSH-琼脂糖珠的制备方法。

众所周知，一些细胞信号转导蛋白，包括 T 细胞受体，存在于称之为“脂筏”的一种富含鞘脂和胆固醇的微结构区。脂筏不溶于去垢剂，因此能够利用非离子去垢剂（如 Triton X-100）进行分离。单元 3.6 介绍了几种分离脂筏及通过 SDS-PAGE 和免疫印迹对脂筏进行分析的方法。同时也介绍了对这些分离出来的不溶于去垢剂的膜成分进行脂质分析所需的方案。

尽管对细胞活化中所发生的生化事件仍有待进一步了解，但业已证实，细胞内钙水平的变化、磷酸肌醇的周转及蛋白质磷酸化是所有活化过程中最基本的事件。因此，第三章中的方案与单元 2.6 所提供的方案相结合，为探讨细胞活化事件提供了最基本的工具。

撰 稿 人：John E. Coligan

单元 3.1　淋巴细胞活化过程中肌醇磷脂周转的分析

受体介导的磷脂酶 C（PLC）的活化引起膜肌醇磷脂的水解，产生二酰甘油（DAG）和水溶性肌醇磷酸（InsP；图 3.1.1）。T 细胞和 B 细胞抗原受体均利用此信号机制，因此，该机制可能介导了受体诱导的胞外 Ca^{2+} 内流过程。

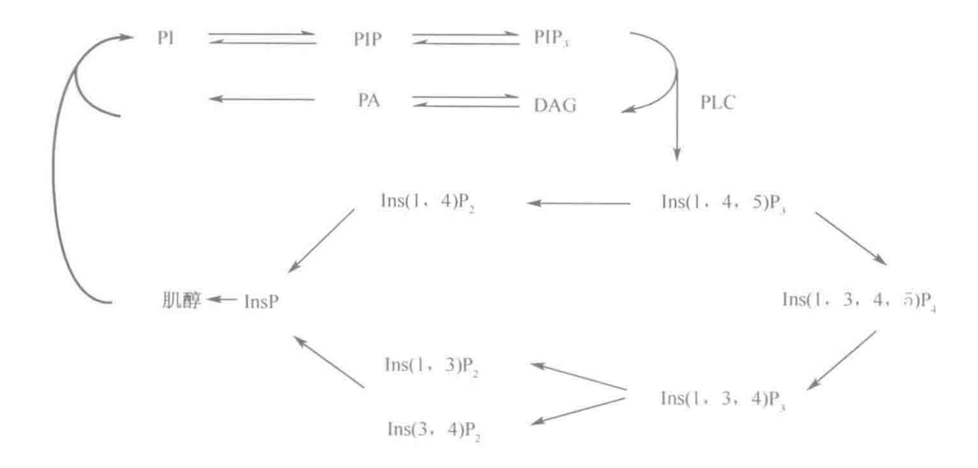


图 3.1.1　多聚磷酸肌醇周转的简化流程（摘自 Downes *et al.*，1989）。

基本方案 1　通过道威克斯（DOWEX）离子交换层析分析 [³H] 肌醇磷酸

材料

细胞（如肿瘤细胞系、杂交瘤、克隆、凝集素刺激的细胞）
添加了 2～20μCi/ml [³H] 肌醇的培养基
平衡盐溶液，或类似的盐溶液，或无抗生素的 RPMI1640-10
10～20mmol/L LiCl（可选）
刺激物
冰预冷的 10%（*m*/*V*）三氯乙酸（TCA），或 50∶100∶1（*V*/*V*/*V*）氯仿/甲醇/浓 HCl 或高氯酸
未标记的 Ins(1,4,5)P_3 和 Ins(1,3,4,5)P_4 [用于 HPLC 分析 Ins(1,3,4,5)P_4]
水饱和乙醚
1∶100 稀释的浓氨水
0.5g/ml 道威克斯 1-X8 树脂（100～200 目；甲酸盐形式；Bio-Rad）混悬于水
60mmol/L 甲酸钠/5mmol/L 四硼酸二钠
0.2mol/L、0.4mol/L 和 0.8mol/L 甲酸铵/0.1mol/L 甲酸
闪烁液（可与含水样本相容；如 Biosafe II，Research Products）
13mm×100mm 玻璃管

直径 0.6cm 的一次性柱子

1. 2×10^6～2×10^7 个细胞/样本在含有 2～20μCi/ml [^{3}H] 肌醇的培养基中，于 37℃，5% CO_2 培养箱中培养 72h。
2. 用台式离心机 300g 离心洗细胞，3 遍，弃上清，重悬于平衡盐缓冲液中。不可含新霉素及其类似物。
3. 吸取 200μl 细胞悬液（2×10^6～10^7 个细胞）至一个微量离心管，于 37℃培养。加入刺激物或适当的对照。如果要研究两种细胞发生的相互作用，在检测开始时将细胞沉淀，以促进细胞之间接触。
4. 在适当的时间间隔加入 1ml 冰预冷的 10% TCA 裂解细胞。或者，加入 50∶100∶1（$V/V/V$）氯仿/甲醇/浓 HCl（如基本方案 2 中描述的）或高氯酸来终止反应。如果要以 HPLC 来分析 Ins(1,3,4,5)P_4，则加入未标记的 Ins(1,4,5)P_3 和 Ins(1,3,4,5)P_4 各 20μg。涡旋混匀并冰浴 30min。4℃，12 000g 微量离心 10min。
5. 将上清移至玻璃管中。在通风橱内，加入 1ml 水饱和乙醚用于萃取酸，用巴斯德吸管吸取上层液体并保留。重复萃取 4 或 5 次。
6. 用 1∶100 稀释的浓氨水（根据不同样本确定用量）中和样本（以 pH 试纸确定），再加入 4ml 水。以道威克斯柱（步骤 7～12）或 HPLC（见备选方案）分析样本。在 4℃可保存数日。
7. 吸取 1.2ml 的 0.5g/ml 道威克斯混悬物至直径 0.6cm 的柱中制备纯化柱。首次实验，加入 [^{3}H] InsP 标准品；否则加入待测样本。
8. 用 30ml 的 60mmol/L 甲酸钠/5mmol/L 四硼酸钠盐洗柱，收集最后 1ml 洗脱液用于闪烁记数。确保放射活性已恢复至洗脱 [^{3}H] 肌醇前的背景水平。
9. 以 6ml 的 0.2mol/L 甲酸铵/0.1mol/L 的甲酸洗脱 [^{3}H] $InsP_1$，每份 2ml 洗脱液。如果是用标准品进行的预实验，确定 [^{3}H] $InsP_1$ 存在于一份 2ml 的洗脱液中。以 2ml 同样的缓冲液洗柱。
10. 以 16ml 的 0.4mol/L 甲酸铵/0.1mol/L 的甲酸洗脱 [^{3}H] $InsP_2$，每份 2ml 洗脱液。如果是用标准品进行的预实验，确定 [^{3}H] $InsP_1$ 存在于一份 2ml 的洗脱液中。以 6ml 同样的缓冲液洗柱。
11. 以 10ml 的 0.8mol/L 甲酸铵/0.1mol/L 的甲酸洗脱 [^{3}H] $InsP_3$，每份 2ml 洗脱液。如果是用标准品进行的首次实验，确定 [^{3}H] $InsP_1$ 存在于一份 2ml 的洗脱液中。以 6ml 同样的缓冲液洗柱。
12. 加入 16ml 的闪烁液于 2ml 的洗脱液中。以液体闪烁计数器检测每分钟的记数，共记 5min。

备选方案　通过 HPLC 方法分析 [^{3}H] 肌醇磷酸

附加材料

[^{3}H] InsP 样本（见基本方案，步骤 6）和标准品
除气的 HPLC 级水
2mol/L 的甲酸铵，以磷酸调至 pH3.7

Whatman Partisil 10 SAX 柱（0.46cm×25cm，10μm 微粒大小）和填充有 Whatman 薄壳型阴离子交换剂的保护柱

1. 在分析样本前先在 SAX 柱上先确定相关标准品的洗脱方案，如 Ins(1,3,4)P_3（约 48min）、Ins(1,4,5)P_3（约 52min）、Ins(1,3,4,5)P_4（约 78min）。
2. 注入 [^{3}H] InsP 样本至 SAX 柱。
3. 全程采用 1.2ml/min 的流速，以除气的 HPLC 级水洗柱 10min。以除气的 HPLC 级水和 2mol/L 甲酸铵建立线性梯度。使用 0～0.8mol/L 甲酸铵的线性梯度洗脱 30min，将 $InsP_1$ 和 $InsP_2$ 洗脱于每份 1min 的洗脱液中。维持 0.8mol/L 甲酸铵的浓度 18min，洗脱 Ins(1,3,4)P_3和 Ins(1,4,5)P_3于每份 0.5min 的洗脱液中。根据线性梯度增加甲酸铵的洗脱浓度至 1.8mol/L，洗脱 15min，将 Ins(1,3,4,5)P_4洗脱至每份 1min 的洗脱液中。
4. 使用完毕后用水洗涤柱子 24h，用甲醇保存（沉淀甲酸铵，填满柱子）。

基本方案 2　通过薄层层析方法分析肌醇磷脂

材料（带√项目见附录 1）

1%（*m/V*）草酸钾/2mmol/L EDTA
溶剂：60∶20∶23∶18∶12（*V/V/V/V/V*）氯仿/甲醇/丙酮/乙酸/水，或 45∶35∶10 氯仿/甲醇/4mol/L NH_4OH
细胞（如肿瘤细胞系、杂交瘤、克隆、凝集素刺激的细胞）
无磷酸盐的培养基（如 GIBCO/BRL）含有 10%（*V/V*）热灭活的胎牛血清（FCS），用 HBSS 或 TBS（附录 1）透析以去除磷酸盐
无载体的 [^{32}P] 正磷酸（296mBq/ml，8mCi/ml）
刺激物
50∶100∶1（*V/V/V*）氯仿/甲醇/浓 HCl
√100mmol/L EDTA，pH7.4
100mmol/L KCl
氯仿
氮
2∶1（*V/V*）氯仿/甲醇
PI、PIP、PIP_2和 PA 标准品（Sigma）
碘
EN^{3}HANCE（Du Pont-NEN）
硅胶板（Baker Si250，J. T. Baker）
110℃烤箱
TLC 缸
Kodak X-Omat 胶片

1. 将硅胶板在 1%草酸钾/ 2mmol/L EDTA 中预层析过夜，风干。使用前 110℃热活化 30min。

2. 将滤纸排列在 TLC 缸中，用足够盖住硅胶板底部 0.5cm 的溶剂进行平衡≥6h。如果使用 [^{3}H] 肌醇标记的样品，则采用 45∶35∶10 氯仿/甲醇/4mol/L NH_4OH 作为溶剂系统。
3. 用 [^{32}P] 正磷酸盐进行无平衡标记时，以无磷酸盐的培养基/10% FCS 洗细胞并重悬于此培养基中。用微量离心管分装为每管 0.2ml，37℃孵育。加入无载体的 [^{32}P] 正磷酸盐至终浓度 0.1～1.0mCi/ml。孵育 3min，然后加入刺激物（如果用 [^{32}P] 正磷酸盐进行标记，则需溶于不含磷酸的液体中）或稀释液对照。在计时上要精确，并使用重复的细胞样品（如 3 个重复样品）。如检测 [^{3}H] 肌醇脂类，则用标记培养基进行刺激（推荐）。
4. 加入 0.8ml 50∶100∶1（*V/V/V*）氯仿/甲醇/HCl 来裂解细胞（细胞来自本方案步骤 3 或者基本方案 1 的步骤 3）。
5. 加入 0.03ml 100mmol/L EDTA，pH7.4，0.1ml 100mmol/L KCl，0.15ml 氯仿，0.15ml 水，涡旋混匀几秒钟。微量离心 2min，移去低层相（含有脂类）。
6. 向剩余的上层相中加入 0.4ml 氯仿，涡旋混匀，微量离心 2min，移去低层相并与步骤 5 中的低层相混合。在氮气中干燥。如有必要，盖上盖子 4℃存放过夜。
7. 重新溶解于 50μl 2∶1 氯仿/甲醇中，迅速点样 20μl 于硅胶板上（来自步骤 1），距离底部 1cm（用铅笔做标记）。在每块板上层析 PI、PIP、PIP_2 和 PA 标准品（每种2～4μg）。室温风干。
8. 将层析板放置于预平衡的 TLC 槽中（来自步骤 2），使其高度达到 15cm（约 1h）。100℃干燥 3min。
9. 在通风橱中用碘蒸气预平衡 TLC 缸几分钟。将板子放置在预平衡的 TLC 缸中 3～5min 使标准品显色（黄色-橙色，会退色）；用铅笔对其进行标记。样品中的 PI（但不是 PIP 和 PIP_2）同时显色。
10. 用 Kodak X-Omat 胶片对板子进行自显影，曝光几小时（[^{3}H] PIP_2 需在－80℃曝光达 2 周）。如果使用 [^{3}H] 肌醇标记的样品，则在自显影前用 EN^{3}HANCE 喷洒层析板，在通风橱中风干过夜。
11. 从层析板上刮下目标脂类，用液体闪烁分光法对放射性进行定量。

参考文献：Downes et al.，1989；Irvine，1986，1990

撰 稿 人：John B. Imboden，Dolores M. Shoback，and Sharon Inokuchi

单元 3.2　抗磷酸化酪氨酸的印迹检测

基本方案　抗磷酸化酪氨酸印迹检测的准备及分析

材料（带√项目见附录 1）

一抗：1mg/ml 4G10 抗磷酸化酪氨酸单抗（Upstate Biotechnology）或类似抗体

√PBS

溶于PBS/0.02%（m/V）叠氮钠的 50%（m/V）蛋白 A-琼脂糖悬液（Pharmacia LKB）

待分析的细胞

刺激物

√2×和 1×裂解液，冰冷

PI/PBS，冰冷

√1mmol/L 原钒酸钠

√1×SDS/上样缓冲液

√封闭液

√含有 Tween 20 的 Tris 平衡盐（TBST）

二抗：碱性磷酸酶（AP）-偶联的抗鼠 Ig（Promega 或 Pierce；1mg/ml 储存液以 1∶7000稀释于 TBST 中）

√显影液

Combitip 分液管

连续分液器

振荡器平台或轨道旋转平台，4℃和室温

95～110℃水浴或类似仪器

0.2μm 孔径的硝酸纤维素膜（Schleicher&Schuell）

Whatman 3MM 滤纸

1. 制备 4G10 单抗包被的珠子。使用 Combitip 分液管和连续分液器，加入 4G10 单抗至一个 1.5ml 微量离心管的侧壁上，1.5μl/个样本。加入 0.5ml PBS。加入 50μl 的 50%蛋白 A-琼脂糖悬液，用尖部削掉 1～2mm 的 Combitip 分液管（以及移液器枪头），以防对琼脂糖珠产生剪切破坏。盖上管盖，置于旋转器上 4℃大于 1h。
2. 按需要刺激细胞，每个样本总体积≤0.5ml。对于体积<5ml 的体系，用等体积的冰预冷 2×细胞裂解液终止反应，立即涡旋混匀，置于冰上裂解 20min（到 2h）。对于体积≥0.5ml 的体系，加入 4～10 倍体积的冰预冷 PI/PBS 终止反应，短时微量离心以沉淀细胞，吸去液体，以 10^8个细胞/ml 的浓度用冰预冷 1×裂解液裂解重悬并裂解细胞沉淀物。
3. 将细胞裂解物转移至另一个离心管，4℃，高速离心 15min。
4. 离心细胞裂解液的同时，以短时离心方式（使离心机达到最高速然后停止）洗涤步骤 1 中 4G10 单抗包被的珠子。吸弃上清仅留 50μl，用移液管加 1.25ml 的冰预冷1×裂解液，以适中的速度直接注入管底部。盖上盖子上下颠倒以使珠子彻底重悬。如前所述短时离心，吸弃上清，留 25～50μl 液体。
5. 将细胞裂解液加到有 4G10 单抗包被珠子的管中，4℃旋转 3～6h。
6. 制备 SDS-聚丙烯酰胺分离胶和浓缩胶。
7. 4℃，高速离心珠子，吸弃上清。如步骤 4，用 1ml 冰预冷 1×裂解液洗 3 次，以 1ml 冰预冷 1mmol/L 原钒酸钠洗一次。吸弃珠子表面所有的液体。
8. 加入 100μl 1×SDS/样本缓冲液，重悬并 95～110℃加热 5min。上样并电泳（如标准的 7.5%、10cm×20cm 胶，45V 电泳 16h）。

9. 如单元 12.5 步骤 1～10 所述，通过免疫印迹将蛋白质转移至 0.2μm 孔径的硝酸纤维素膜，50V 电压转膜 4h。
10. 剪除硝酸纤维素膜上不需要的部分。如果在 24h 内不使用，则放在 Whatman 3MM 滤纸上至干燥，避光、保持干燥放于盒子中（如抽屉中）保存直到使用。
11. 放入封闭液中室温 1h（或 4℃过夜）。封闭及后续的洗膜过程均在振荡器上振荡进行。
12. 弃去封闭液，加入 1∶1000 稀释于 TBST 中的 4G10 单抗（如用 1000ml 吸头盒盖作容器则加入 20ml）。在轨道旋转器中 4℃孵育过夜，或在振荡器上室温孵育 4h。如果需要，抗体可重复使用数次（需记录使用次数），加入 0.02%的叠氮钠（终浓度）后存于 4℃。弃去抗体溶液，以 50ml 的 TBST 室温洗 3 次，每次 5min。
13. 加入 AP 偶联的抗鼠 Ig 二抗（如用吸头盒盖作容器则加入 10ml），室温孵育 1h，如步骤 12 以 TBST 洗 3 次。
14. 加入 10ml 的显色液，孵育 60s～15min。当显色信号最佳时弃去显色液，加水终止反应。也可在 15min 后将显色弱的条带加入新鲜的显色液继续显色，直至终止反应。以水洗涤数次，在滤纸上干燥至仅有少许潮湿。避光保存在塑料夹层中，可在几天内拍照或保存数月。

备选方案　使用 ^{125}I 标记蛋白 A 进行检测

附加材料

洗液：含有 0.5%（*m/V*）BSA 和 0.2%（*V/V*）NP-40 的 TSA 液

30μCi/μg ^{125}I 标记的蛋白 A（70～100μCi/μg；ICN Biomedicals），溶于含有 0.5%（*m/V*）BSA 的 TSA 液（终浓度 0.5μCi/ml）

√ Tris/盐/叠氮化合物（TSA）溶液

1. 如基本方案步骤 1～12 进行操作。
2. 以洗液洗膜 3 次，每次 10min。本次洗膜及后续的洗膜过程均在室温于振荡器上振荡进行。
3. 弃去最后一次洗膜的液体，加入 30ml 的 0.5μCi/ml ^{125}I 标记蛋白 A。置室温振荡器上孵育 1h。
4. 弃去 ^{125}I 标记的蛋白 A 溶液，以洗液洗膜 4 次，每次 10min。
5. 以 TSA 洗膜 4 次，每次 10min。干燥后进行放射自显影。

参考文献：Klausner and Samelson，1991；Ullrich and Schlessinger，1990

撰 稿 人：Jeffrey N. Siegel

单元 3.3　免疫复合物方法检测酪氨酸蛋白激酶

由于酪氨酸蛋白激酶（TPK）的低丰度表达及其快速活化与失活，使之很难利用常规的生化途径进行纯化。通过免疫复合物蛋白激酶实验，可检测特定 TPK 的存在与

否及其功能状态。

基本方案　酪氨酸蛋白激酶的免疫沉淀和自身磷酸化检测

以下步骤可以采用淋巴或非淋巴细胞、原代细胞或培养的细胞系、活化或非活化的细胞。

材料（带√项目见附录1）

待检测的细胞
√冰预冷的 PBS
含蛋白酶抑制剂的1×细胞裂解液（新鲜配置并于冰上保存）
√含蛋白酶抑制剂的5×裂解液（细胞活化用，新鲜配制并于冰上保存）
考马斯蛋白检测试剂（Pierce）或类似试剂
多克隆或单克隆的兔抗 src-相关 TPK 抗血清（UBI、Oncogene Science 或 Santa Cruz Biotechnology）
对照血清（Sigma）：正常的兔血清（如使用多克隆抗血清），或同型 IgG（如使用单克隆抗血清）
Pansorbin（10%福尔马林固定的金色葡萄球菌；Calbiochem），或蛋白 A/蛋白 G-Sepharose（Pharmacia Biotech）
亲和纯化的兔抗鼠 IgG（如使用单克隆抗体；Organon Teknika Cappel）
√冰预冷的 NP-40 缓冲液
√冰预冷的酪氨酸蛋白激酶（TPK）缓冲液
√10μmol/L ATP 溶液，新鲜配制
5mCi/ml [γ-^{32}P] ATP（3000Ci/mmol；Du Pont NEN）：在准备反应混合物前一小时将其在冰上融化
√冰预冷的改良 RIPA 缓冲液
√1×SDS/上样缓冲液
细胞刮具（用于贴壁细胞）
Labquake 摇床（PGC Scientific）
100℃加热块
Whatman 3MM 滤纸

注：除洗涤外，所有的步骤均在冰上或4℃冷室进行。

收集无需活化的细胞。

1a. 对于悬浮细胞，需室温，500g 离心 10min 收集，弃上清，以冰预冷的 PBS 重悬细胞。如前所述离心和弃上清。对于贴壁细胞，当细胞贴壁时以 5～10ml 冰预冷的 PBS 洗一次，旋动并吸弃 PBS。于 10^7～10^8 个细胞加 2～3ml 冰 PBS，以细胞刮具收集细胞。如前所述悬浮细胞的条件离心。如有必要，于－70℃保存细胞沉淀，细胞裂解物不能冰冻（步骤 5）。

2a. 加入 1ml 冰预冷的含蛋白酶抑制剂的 1×细胞裂解液并涡旋混匀，冰上静置 10min。

收集不同时间进程的活化细胞。

1b. 将细胞分成每份 1ml，分别以适当的刺激物刺激至所需时间（如单元 2.6 和单元 2.11；Eiseman and Bolen，1992）。

2b. 每份加入 255μl 冰预冷的含蛋白酶抑制剂的 5×细胞裂解液，并涡旋混匀，冰上静置 10min。

3. 将细胞裂解物转移至微量离心管中，4℃，高速离心 3min 以沉淀不溶物质，将上清移至新管。

4. 用考马斯蛋白测定试剂或等同物，对每份 1～5μl 裂解液进行蛋白质定量。

5. 准备两只离心管，各装有 100μg～1mg 蛋白质，并用含有蛋白酶抑制剂的 1×细胞裂解液调整体积至 500μl。

6. 一管（样本管）中加入 1～10μl 抗 src-相关 TPK 抗血清（稀释比例已经优化），加入等量对照血清至另一管。涡旋混匀并冰浴 1h。

7a. 若使用多克隆抗 TPK 血清：加 50～100μl Pansorbin（或 50～100μl 蛋白 A-/蛋白 G-Sepharose）至每个管子，4℃置 Labquake 振荡器/旋转器上颠倒混合 1h。

7b. 若使用单克隆抗 TPK 血清：加入 50μl 兔抗鼠 IgG 至 1ml Pansorbin（或 50～100μl 蛋白 A-/蛋白 G-Sepharose）中，4℃颠倒混合 30min。高速离心 30s 洗去未结合的抗体，加入 1ml NP-40 缓冲液，剧烈涡旋混匀。重复洗涤并重悬于 1ml 冰预冷 NP-40 缓冲液重悬。加 50μl 此混合物至步骤 6 的每管中，4℃置 Labquake 摇床上颠倒混合 1h。

8. 室温，离心 30s 以沉淀免疫复合物，弃上清。

9. 洗涤沉淀（免疫沉淀物）3～5 次：如前所述，用 1ml 的冰预冷 NP-40 缓冲液，剧烈振荡以重悬沉淀，离心。

10. 以 1ml 冰预冷 TPK 缓冲液洗涤沉淀，使之与反应缓冲液平衡。

11. 配制激酶反应混合物（每个反应 25μl）：

    20μl TPK 缓冲液
    2.5μl 10μmol/L ATP 溶液
    2.5μl [γ-^{32}P] ATP。

    用 25μl 反应混合物涡旋混匀以重悬免疫沉淀物，室温在 Eppendorf 混合器上孵育2～10min。

12. 室温，高速离心 30s 以洗涤免疫复合物，洗 3～5 次。重悬于 1ml 冰预冷 RIPA 缓冲液，剧烈振荡。将上清弃于放射性废物桶中。

13. 以 50μl 1×SDS 样本缓冲液重悬沉淀，涡旋混匀，室温孵育 15～30min。室温，离心 30min，将上清移至新离心管。将沉淀弃于放射性废液容器中。样品在 100℃加热块上加热 5min，微离心 15s 以收集所有凝结在管壁上的液体。上样，进行 8% SDS-PAGE 电泳。

14. 将胶置于 Whatman 3MM 滤纸上在常规的干胶器上干燥，通过放射自显影使蛋白质显影。

备选方案 1　蛋白激酶对外源底物的磷酸化检测

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

√外源底物（兔-肌肉烯醇酶或 α-酪蛋白；根据经验确定类型和用量）
√100μmol/L ATP 溶液（新鲜配制并于冰上保存）
√2×SDS/上样缓冲液
凝胶固定剂：3∶1∶6（V/V/V）甲醇/冰乙酸/水

1. 如基本方案步骤 1～10 制备和洗涤免疫复合物。
2. 配制激酶反应混合物（每个反应 25μl）：
   10～19μl TPK 缓冲液（至总体积 25μl）
   1～10μl 1mg/ml 外源性底物
   2.5μl 10μmol/L ATP 溶液
   2.5μl [γ-^{32}P] ATP。
   用 25μl 反应混合物重悬免疫沉淀物，室温在振荡器上孵育 1～5min。
3. 加入 25μl 2×SDS 样本缓冲液，涡旋混匀，室温孵育 15～30min。室温，高速离心 1min，将上清移至新管，将沉淀弃于放射性废液容器中。100℃加热 5min，微离心 15s。
4. 将样本上样至 8%的 SDS-PAGE 胶，电泳。
5. 将胶在凝胶固定剂中浸泡孵育 1h，更换凝胶固定剂继续孵育，将用后的固定剂弃于放射性废液容器中。
6. 将胶置于 Whatman 3MM 滤纸上在常规的干胶器上干燥，通过放射自显影使蛋白质显影。

备选方案 2　蛋白激酶对外源底物的磷酸化检测

附加材料

1mg/ml RR-SRC 肽（GIBCO/BRL）溶于 TPK 缓冲液
√100μmol/L ATP 溶液
冰乙酸
10%（V/V）三氯乙酸
75mmol/L 磷酸
圆形磷酸纤维素滤纸（可采用整张的，GIBCO/BRL）

1. 如基本方案步骤 1～10 制备和洗涤免疫复合物。
2. 配制激酶反应混合物（每个反应 25μl）：
   10～19μl TPK 缓冲液（至总体积 25μl）
   5～20μl 1mg/ml RR-SRC 肽
   2.5μl 100μmol/L ATP 溶液
   2.5μl [γ-^{32}P] ATP。
   用 25μl 反应混合物重悬免疫沉淀物，室温在 Eppendorf 混合器上孵育 1～5min。

3. 高速离心 30s 以沉淀 Pansorbin，将上清移至新管，加入冰乙酸至终浓度 30%（*V*/*V*），以终止磷酸化反应。
4. 如果内源性磷酸化的蛋白质对背景未有显著影响，则继续步骤 5；若有显著影响，加入 1 倍体积 10%（*V*/*V*）三氯乙酸，冰浴 10min，10 000*g* 离心 2min，将上清移至新管。
5. 用铅笔在圆形磷酸纤维素滤纸上做标记（每个反应标记一个），点 1～10μl 的每份上清到一个盘上，在含有 250～500ml 的 75mmol/L 磷酸的烧杯中洗涤圆盘，室温静置 5min，用磁力搅拌子或搅拌棒搅拌，更换磷酸重复洗涤 4 或 5 次。
6. 通过液闪仪记数圆形磷酸纤维素滤纸上掺入的放射活性。

参考文献：Hunter and Sefton，1991

撰 稿 人：Anne L. Burkhardt and Joseph B. Bolen

单元 3.4　识别特异性酪氨酸磷酸化多肽抗体的制备

抗磷酸肽的抗体可以识别仅处于磷酸化状态的蛋白质。该抗体不与同种的未磷酸化蛋白质或其他磷酸蛋白质发生交叉反应。由于蛋白质的磷酸化状态通常反映一种蛋白质的功能状态或活性，因此利用此种抗体是检测蛋白质功能状态的便捷手段。

注：对于基本方案 1 和 2，必须了解目的蛋白的序列和磷酸化位点。

基本方案 1　多克隆抗磷酸肽抗体的制备

附录 2E 中提供了家兔免疫方法，并且许多研究机构具有免疫家兔并制备抗血清所需的核心设施。在单元 13.1 和单元 13.3 中提供了用于免疫的多肽与载体蛋白偶联的常规方法。可以通过抗磷酸化酪氨酸的免疫印迹来证实偶联反应的效果。

证实抗体特异性最方便的方法是利用磷酸化和非磷酸化蛋白质的免疫印迹分析（单元 12.5）。将纯化的磷酸化与未磷酸化状态的同种蛋白质及一些可能有交叉反应的蛋白质跑电泳，使用纯化的抗磷酸肽抗体进行免疫印迹，以鉴定可能发生反应的磷酸化蛋白。免疫印迹同样可以在每一步层析纯化之后进行，用于检测纯化的成功与否。

免疫后兔血清的免疫反应滴度也应设计试验进行评价，传统的筛选实验包括测定粗制血清免疫沉淀已知细胞裂解液中目的磷酸肽的能力，以及粗制血清与纯化的磷酸化目的蛋白的免疫印迹检测。

本方案中操作步骤之间的关系如流程图 3.4.1 所示。

材料

BSA-琼脂糖亲和基质（Sigma）填装（如辅助方案 2）于柱床体积 10ml 的层析柱

磷酸化酪氨酸亲和基质层析柱（10ml 柱床体积；见辅助方案 3）

磷酸肽-BSA 偶联物免疫家兔的粗制血清

PBS/叠氮钠：含有 0.02%（*m*/*V*）叠氮钠的 PBS（附录 1）（可长期保存于 4℃或室温）

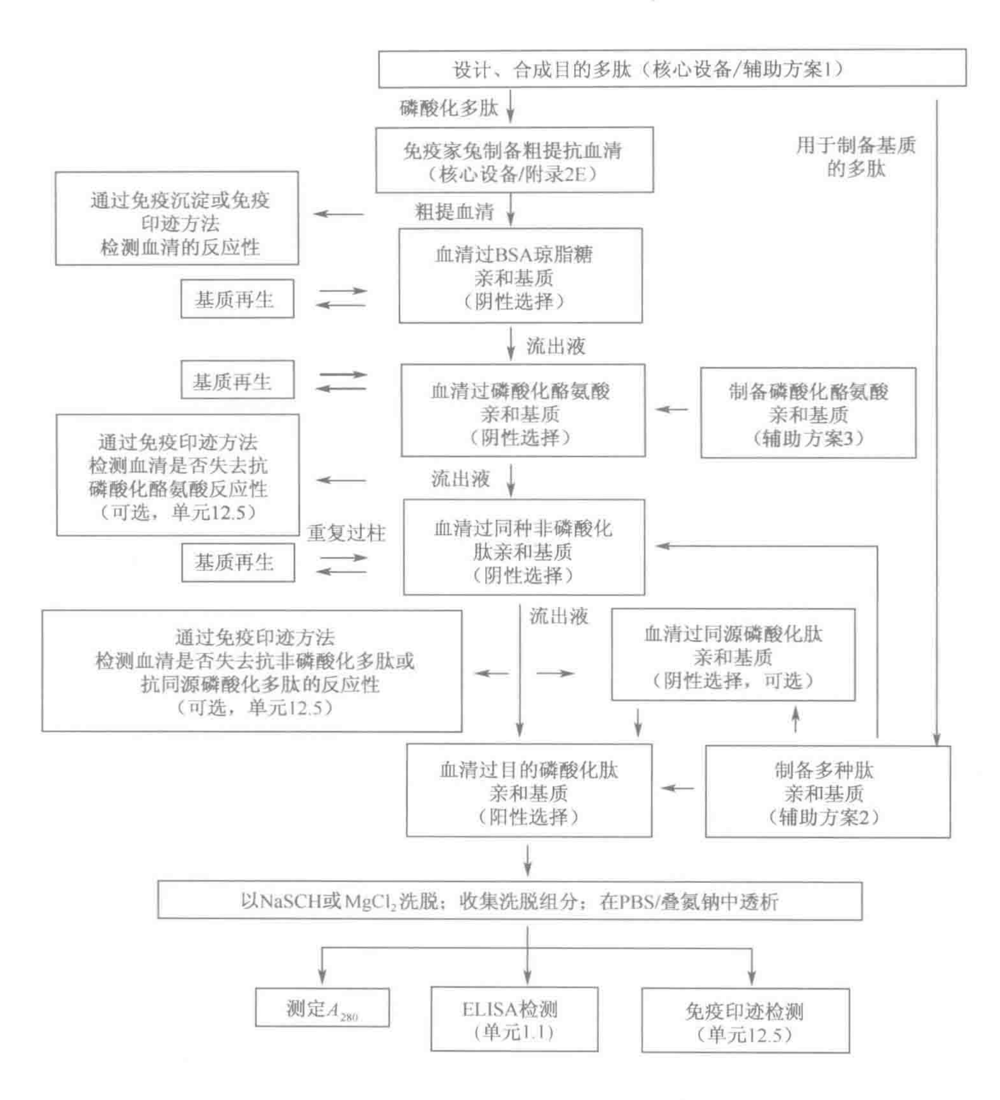


图 3.4.1　多克隆抗磷酸肽抗体产生流程图。

3mol/L NaSCN

同种非磷酸肽亲和基质层析柱（3ml 柱床体积；见辅助方案 1 和 2）

同源磷酸肽亲和基质层析柱（可选；3ml 柱床体积；见辅助方案 1 和 2）

阳性选择的磷酸肽亲和基质层析柱（3ml 柱床体积；见辅助方案 1 和 2）

3.5mol/L 和 4.5mol/L $MgCl_2$（可选）

透析袋（MWCO 12 000～14 000；宽 10mm，直径 6.4mm；如 Spectrum 的 Spectra/Por 4）

注：所有以下的层析步骤均在室温下进行，液体均以重力作用上柱。

1. 将洗涤后的 BSA-琼脂糖与磷酸酪氨酸亲和基质层析柱相连。
2. 将 15ml 的粗制血清通过重力作用流过两柱，以 PBS/叠氮钠洗，直到所有黄色血清均通过层析柱（或以分光光度计测流出液的 A_{280} 吸光度，直至达到基线）。再以 5～

10ml PBS/叠氮钠洗柱，收集所有穿出液，其中可能含有目的抗体。

每一次过柱后血清的体积会增加，这将延长下一次过柱的时间。如果通过观察血清的黄色程度来确定液体流穿的进程，则血清越被稀释后就越不容易观察。

3. 可选：留取部分粗制血清组分及第一次的穿出液，用于后续分析及对比每一次纯化的组分。如果有必要，可立即通过免疫印迹对含有多种磷酸化酪氨酸蛋白的样本进行分析（单元 12.5），以排除无反应的组分。也可以留取部分纯化的组分用于接下来的分析，然后继续下一步骤。
4. 血清过柱后，以 10 倍柱床体积的 3mol/L NaSCN 和 10 倍柱床体积的 PBS/叠氮钠再生柱子，4℃保存于 PBS/叠氮钠中备用。
5. 将穿出的血清组分尽量多次过同种非磷酸肽亲和基质柱，以尽量减少交叉反应。以 10 倍柱床体积的 3mol/L NaSCN 和 10 倍柱床体积的 PBS/叠氮钠再生柱子。分析每次或多次过柱的血清或保留部分组分待以后分析。
6. 如果预期与同源的磷酸蛋白有交叉反应，则使用步骤 5 中提供的方法使穿出的血清组分通过同源磷酸肽亲和基质柱。
7. 在收集阳性选择亲和纯化的穿出峰之前，将 25cm 的透析袋水化并洗涤。透析袋一端用透析夹夹紧，检查是否渗漏，配制 6L PBS/叠氮化合物，4℃保存用作透析液。
8. 将上次层析步骤所得到的流穿血清通过阳性选择的磷酸肽亲和基质柱 3 次（使抗体亲和基质的相互作用最大化），在每次之间不需洗柱。
9. 收集最后一次穿出的血清，用 5～20ml 的 PBS/叠氮钠洗柱（根据柱前体积和柱床体积），将洗涤物与流穿的血清合并，另用 20ml 的 PBS/叠氮钠洗柱，收集流穿液体作为“洗涤”峰。
10. 以多种促溶剂洗脱：可以选用 20ml 3mol/L NaSCN（最佳选择）或 10ml 3.5mol/L $MgCl_2$（可能会产生沉淀，减慢流速）洗脱后加 10ml 4.5mol/L $MgCl_2$洗脱。开始洗脱时，立即收集每份 3ml 洗脱液到步骤 7 中准备的透析袋中，用透析夹将近端的袋口夹紧并立即投入 PBS/叠氮钠透析液中。或者也可以收集 3ml 洗脱液到透析管中，一旦收集每一组分完毕，立即将透析液加入透析管中。收集至少 6 个组分（大多数抗体在前 3 个组分中，2～3 个柱床体积），如前所述再生柱子（步骤 4）。
11. 在 PBS/叠氮钠中于 4℃对步骤 10 收集的所有组分进行彻底透析。
12. 检测 280nm 吸光度或用蛋白比色法测定透析后组分的蛋白质浓度，并计算产量（15ml 血清得到≥1mg 纯化抗体）。分装抗体保存于－70℃，正在使用的抗体保存于 4℃。
13. 用 ELISA（单元 1.1）或免疫印迹（单元 12.5）分析最终样本以及以前步骤中保存的纯化组分的反应性和交叉反应性。

基本方案 2　制备抗磷酸肽的单克隆抗体

附录 2E 中提供了常规的小鼠免疫及单抗制备方法，许多研究机构具有完成此项试验所需的核心设施。

利用 ELISA 方法（单元 1.1）筛选与同种磷酸肽发生反应的克隆，并剔除与同种磷酸肽上其他表位发生交叉反应的克隆。在用 ELISA 筛选候选的杂交瘤上清液时，需要额外合成很多肽，以筛选出具有目的反应性且无交叉反应性的克隆。

本方案中操作步骤之间的关系如流程图 3.4.2 所示。

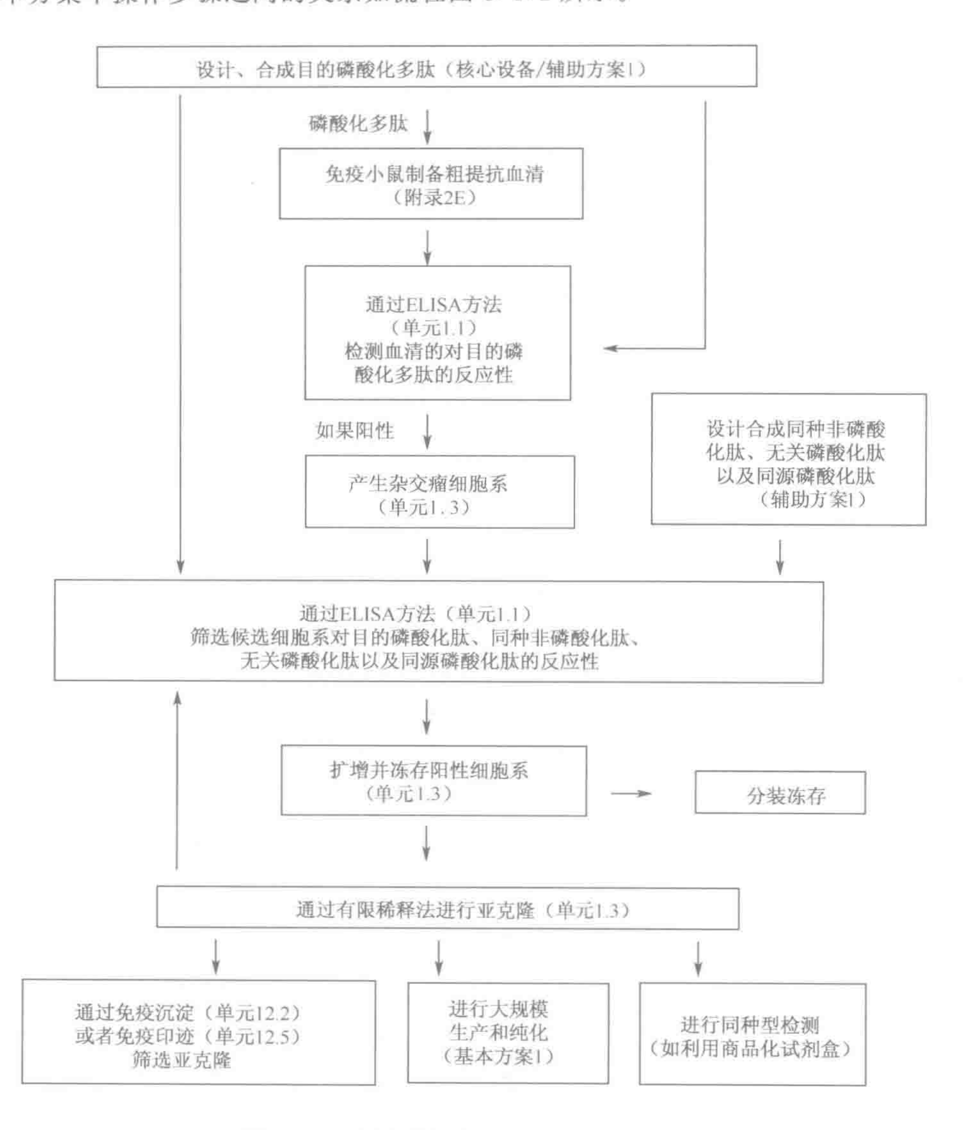


图 3.4.2　单克隆抗磷酸肽抗体产生流程图。

材料（带√项目见附录 1）

融合后的候选杂交瘤细胞系（单元 1.3）

√DMEM/HT 完全培养基

√筛选稀释液

同种磷酸肽-BSA 偶联物（作为 ELISA 抗原；辅助方案 1 和单元 13.1、单元 13.3）

阴性对照：用于制备杂交瘤细胞系小鼠的免疫前血清

阳性对照：用于制备杂交瘤细胞系小鼠的免疫血清

同种非磷酸酪氨酰基肽-BSA 偶联物（作为 ELISA 抗原；单元 13.1、单元 13.3）

非同种磷酸酪氨酰基肽-BSA 偶联物（作为 ELISA 抗原；单元 13.1、单元 13.3）
BSA 偶联的同源磷酸肽（可选；作为 ELISA 抗原；单元 13.1、单元 13.3）
96 孔聚苯乙烯组织培养板
网格记录纸

1. 用 HT 培养基将融合的候选杂交瘤细胞系以低密度（目的是达到每 3 个孔 1 个细胞）接种于 96 孔聚苯乙烯组织培养板（单元 1.3），2 周左右测定，通过记录 96 个网格记录纸上每个孔上的克隆数目来鉴定所有单克隆杂交瘤培养孔，作为可能的候选株，为便于鉴别，在每个含有单个克隆的孔的下方做标记。
2. 使用无菌技术，从每个可能候选株的孔中移出等份上清（如从 200μl 中移出 100μl）至另一个 96 孔板（筛选板）中，在网格记录纸上记录原始板的编号、孔的位置以及相对应板的编号、孔的位置。原始孔每孔再补加以 100μl，37℃预热的新鲜 HT 培养基。如果需要，用亮色的孔状大小的胶贴粘贴在板盖表面以示标记。如果上清没有立即进行检测，则将筛选板塑料袋包好存放于 4℃。
3. 筛选板中每孔上清液加入 150μl 筛选稀释液（防止微生物污染并扩大体积）。
4. 以同种非磷酸肽-BSA 偶联物为抗原进行 ELISA（单元 1.1），对筛选板中每一候选杂交瘤上清的部分组分（如 50μl）进行筛选。记录每个阳性样本筛选板的编号、孔的位置以及相对应的原始板编号、孔的位置，同时测定融合用小鼠的免疫前血清（阴性对照）和同一只小鼠的免疫血清（阳性对照），在 HT 培养基∶筛选稀释液 1∶1混合液中按 1∶100 稀释。同时也对空白筛选稀释液进行 ELISA 检测（作为附加的阴性对照）。
5. 以同种非磷酸肽-BSA 偶联物为抗原，顺次或同时对步骤 4 筛选出的每个阳性样本的部分组分进行 ELISA（单元 1.1）检测，以剔除非磷酸化反应性的克隆；以非同种无关磷酸酪氨酰基肽-BSA 偶联物为抗原进行 ELISA 检测，以剔除具有其他磷酸酪氨酸反应性的克隆。此外，如果预期可能与同源磷酸化蛋白有交叉反应，则以 BSA 偶联的同源磷酸肽为抗原以剔出任何可能的同源磷酸化蛋白交叉反应。如果有必要，也可以同时筛选具有非磷酸化同种肽的特异反应性的克隆。
6. 将克隆扩大培养，以满足筛选所需的所有试验。冷冻部分组分备用。通过有限稀释（单元 1.3）对剩余的细胞进行亚克隆。
7. 如步骤 4 和 5，筛选亚克隆的上清，检测抗体的持续分泌和特异性。将具有代表性的独立亚克隆与其原始的母代克隆区分开来，因为难以预测每个母代单克隆抗体是否能够识别同种磷酸化全蛋白，或者能否用于日后的各种类型免疫检测。扩大培养和冻存候选亚克隆。最好经过多轮传代和冻存、复苏、再扩大培养后，连续检测抗体的特异性和分泌持续性（推荐）。
8. 进一步对亚克隆进行鉴定，选取最有用的克隆，分析培养上清液在特定的免疫检测（如免疫共沉淀，如单元 12.2 中所述；或免疫印迹，如单元 12.5 中所述）中与同种磷酸化全蛋白的反应性。
9. 可选：将目的克隆大量培养获取培养上清制备抗体，并进行亲和纯化（见基本方案 1），或制备腹水（单元 1.4），腹水可通过硫酸铵沉淀而后进行亲和纯化。如果有必要，可以利用商业化的试剂盒（如 Pierce 或 Sigma）进行亚型分析。

辅助方案 1　肽的合成

目前，大多数含磷酸酪氨酰基的肽是利用 9-芴甲氧羰基（Fmoc）磷酸酪氨酸合成的。由于在磷酸酪氨酸上缺乏一个侧链保护性基团（Kitas *et al.*，1994），标准 Fmoc 合成和裂解步骤才得以应用（Chang and Meienhofer，1978）；然而，要想达到氨基酸的有效偶联，在加入未保护的磷酸酪氨酸后，需要比标准步骤用量更高的超浓度的活化 Fmoc 氨基酸。在有些情况下，需要用双偶联法，即在加入磷酸酪氨酸之后再加入少量其他氨基酸以延长肽链。这种替代方法需要按合成肽的要求，有顺序地、反复加入下一个指定氨基酸。在本单元中阐述将肽偶联到亲和基质上的方法（见辅助方案 2），将肽段偶联到载体蛋白的常用方法将在单元 13.1 和单元 13.3 中阐述。

辅助方案 2　肽段偶联到 Affi-Gel 10 亲和性基质

此方案描述了将磷酸肽和非磷酸肽偶联到 Affi-Gel 10 亲和性基质上的方法，用于抗体的亲和柱层析纯化。这一步骤可生成 3ml 终末柱床体积的亲和性树脂，每毫升凝胶偶联 3μmol 肽。

材料

用于偶联的合成寡肽（见辅助方案 1）
二甲基亚砜（DMSO）
N-甲基吗啉（99%纯度；Acros Organics）
Affi-Gel 10（Bio-Rad）或类似活化支持基质
氨基乙醇
0.1mol/L 氨基乙醇 · HCl，pH8.0
高盐/高 pH 溶液：0.5mol/L NaCl/0.4%（*m*/*V*）碳酸氢钠
高盐/低 pH 溶液：0.5mol/L NaCl/100mmol/L 乙酸钠，pH4.2
PBS/叠氮钠：含有 0.02%（*m*/*V*）叠氮钠的 PBS（附录 1）
0.5mol/L NaCl
3mol/L NaSCN
聚丙烯螺旋盖离心管
直立圆筒（end-over-end）摇床
真空吸引器
玻璃层析柱，容量≥5ml（Bio-Rad），或带有 1-cc 硅化玻璃棉塞子的 5ml 塑料注射器

1. 将合成寡肽按 0.5～4 倍所需柱床体积的容量比溶解于 DMSO。例如，9μmol 肽（15.3mg，对于一个平均 15mer 分子质量为 1700 的肽）对应 3ml 柱床体积。
2. 按如下操作小心滴定以中和肽溶液：以 1～2μl 增量加入肽合成级 *N*-甲基对氧氮己环（高浓度或在 DMSO 中稀释到 1∶1～1∶9），每次加入后移出 2～3μl 等份，将其用 50μl 水稀释，然后点在 pH 试纸条上。重复这一步骤，直到 pH 达到 7～8（基本上每 3μmol 肽需要 7～8μl，取决于氨基酸序列）。

3. 充分混匀 Affi-Gel 10 亲和性基质瓶中的内容物，使树脂悬浮，然后将所需体积的树脂［2 倍于柱体积（4 倍于 50%混悬物）的树脂］移至聚丙烯螺旋盖离心管，在 DMSO 中洗 3 次，每次在室温下以 700*g* 转速离心 5min。吸出上清液，以 5 倍体积 DMSO 重悬树脂，然后再次以 700*g* 转速离心。不要超过推荐的转速进行离心，否则可能破坏树脂。
4. 从树脂中吸出过量的 DMSO，加入步骤 2 制备好的肽溶液，在室温下用直立圆筒振荡器孵育过夜。每毫升树脂加入 2μl 纯氨基乙醇（消除未反应的酯基团），在室温下用直立圆筒摇床孵育 2h，如步骤 3 在 DMSO 中洗 2 次。
5. 如步骤 3 在 pH8.0 的 0.1mol/L 氨基乙醇 · HCl 中洗 2 次（第 1 次要在冰上进行，因为会产生大量热量），第 2 次洗涤后移出 0.1mol/L 氨基乙醇 · HCl，更换新溶液，在 4℃下用直立圆筒摇床孵育过夜，然后低速离心并吸出上清液。
6. 利用步骤 3 中描述的方法，用高盐/高 pH 溶液洗 3 次、高盐/低 pH 溶液洗 3 次、PBS/叠氮钠洗 3 次，洗涤后的树脂保存于 4℃，直至装于层析柱。
7. 用 0.5mol/L NaCl 将基质混合为混悬物，然后灌入玻璃层析柱或带有 1-cc 硅化玻璃棉塞子的 5ml 塑料注射器底部，先后用 10 倍于柱体积的 3mol/L NaSCN 和 10 倍于柱体积的 PBS/叠氮钠洗涤每个层析柱。

辅助方案 3　磷酸酪氨酸偶联到 Affi-Gel 10 亲和基质

此步骤可生成 10ml 终末柱床体积的亲和性树脂，每毫升 Affi-Gel 10 偶联 3μmol 磷酸酪氨酸。

材料

磷酸酪氨酸
0.4%（*m*/*V*）碳酸氢钠
1mol/L NaOH（可选）
氨基乙醇
0.1mol/L 氨基乙醇 · HCl，pH8.0
烧结玻璃漏斗和真空吸引器
玻璃层析柱，容量≥14ml（Bio-Rad）

1. 将磷酸酪氨酸按 0.5～4 倍的预期柱床体积的容量比溶解于 0.4%碳酸氢钠。例如，30μmol 磷酸酪氨酸（7.8mg，对于相对分子质量为 261 的磷酸酪氨酸）对应 10ml 柱床体积。如果简便些，可以多用些磷酸酪氨酸，因为它相对比较便宜。
2. 用 pH 试纸条测定 pH 达到 7～8。如果有必要调整，可通过滴定来中和溶液，如加入少量 1mol/L NaOH，每次加入后移出 2～3μl 等份，然后点在 pH 试纸条上。重复这一步骤直到 pH 达到 7～8。
3. 充分混匀 Affi-Gel 10 亲和基质瓶中的内容物，使树脂悬浮，然后将所需体积的树脂［2 倍于柱体积（4 倍于 50%混悬物）的树脂］移至连接真空抽吸器的玻璃陶瓷漏斗。洗 3 次，每次向树脂上灌入冷蒸馏水后进行抽吸，然后以同样方法用冰冷的 0.4%碳酸氢钠洗涤最后一次。

4. 用真空抽吸从凝胶中吸出大部分多余的液体，不必使其完全干燥，将其移至螺旋帽离心管，加入步骤 2 备好的磷酸酪氨酸溶液，树脂从瓶中移出（步骤 3）到与磷酸酪氨酸溶液混合的时间间隔不要超过 20min。在 4℃下用直立圆筒摇床孵育过夜。
5. 每毫升树脂加入 2μl 纯氨基乙醇（消除未反应的酯基团），在室温下用直立圆筒振荡器孵育 2h。洗树脂 2 次，每次低速离心（见辅助方案 2，步骤 3）并吸出上清液，以 5 倍体积 0.4%碳酸氢钠重悬树脂，然后再次低速离心。
6. 如步骤 4 在 pH8.0 的 0.1mol/L 氨基乙醇 · HCl 中洗 2 次，第 2 次洗涤后移出 0.1mol/L 氨基乙醇 · HCl，更换新溶液，在 4℃下用直立圆筒摇床孵育过夜，然后低速离心并吸出上清液。洗涤、保存、填装树脂于层析柱中（见辅助方案 2，步骤 7）。

参考文献：Czernik *et al.*，1991

撰 稿 人：Michael P. DiGiovanna，David F. Stern，and Robert R. Roussel

单元 3.5 T 细胞中丝裂原活化的蛋白激酶（MAPK）活性分析

基本方案 1 免疫复合物蛋白激酶测定

此方法可用于测定 ERK、JNK 和 p38 MAPK 的活性，也可使用针对每个 MAPK 组分的商品化抗体。然而，特定的抗体对各组分内特定的亚型会显示一定的特异性。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠 T 细胞（每个试验 0.5×10^6～1.0×10^6 个细胞；单元 2.1）
√Triton 裂解液（TLB），冰冷的
抗 MAPK 多克隆抗体（Santa Cruz Biotechnology）：C-14（ERK2）；C-17（JNK1）；C-20（p38）
√50%（*V*/*V*）蛋白 A-琼脂糖悬液
√激酶缓冲液（KB）
2mg/ml GST-MAPK 底物（见辅助方案）：GST-Elk1（310-428），或髓磷脂碱性蛋白（MBP；Sigma）用于 ERK2，GST-cJun（1-79）用于 JNK1，或 GST-ATF2（1-109）用于 p38α/β
1mmol/L ATP（Sigma；分装保存于－20℃）
10mCi/ml [γ-^{32}P] ATP（6000Ci/mmol；Amersham Pharmacia Biotech）
√4×SDS 凝胶上样缓冲液
12%SDS-PAGE 小型胶（单元 12.3）
√考马斯染料
√脱色液
冷冻离心机

振荡平板混合器

30℃和 100℃加热块

Whatman 3MM 滤纸

注意：有相当高比例的［γ-^{32}P］ATP 并未掺入底物，并在电泳时随着染料前沿移动。因此：①使染料前沿跑出凝胶底部进入电泳缓冲液，作为液态放射活性废物弃置；②存留在凝胶底部，可用手术刀切除，在凝胶染色前作为固态放射性废物弃置。

1. 4℃，1000*g* 离心 T 细胞悬液 10min，移出上清液，并用 100μl 冰冷 TLB 小心上下吹吸重悬沉淀物。在冰上孵育 15min，4℃，15 000*g* 离心 10min，将上清移至新的 1.5ml 小离心管，冰上保存。
2. 在准备细胞裂解物时，将抗体预结合在蛋白 A-琼脂糖上：将经验量的抗 MAPK 抗体（1～2μg/0.5×10^6～1.0×10^6 个细胞）与 400μl TLB 和 20μl 50%蛋白 A-琼脂糖混悬物置于 1.5ml 小离心管内，于振荡平板混合器上 4℃孵育 30min。
3. 4℃，最高转速短暂离心 5s，收集管底琼脂糖珠，吸弃上清。将结合有抗体的蛋白 A-琼脂糖凝胶洗 2 次，每次加入 1ml TLB，4℃，最高转速短暂离心 5s，收集琼脂糖珠，吸弃上清。
4. 将步骤 1 获得的澄清的细胞裂解液加入到结合有抗体的蛋白-A 琼脂糖中，再加入 TLB 使总容量达到 400μl。在旋转平台上 4℃孵育至少 3h（过夜亦可）进行免疫沉淀反应。
5. 用步骤 3 阐述的方法洗涤蛋白 A-琼脂糖珠 3 次，每次用 1ml TLB。继续洗 2 次，每次用 1ml KB。确保在最终洗涤完毕后，所有多余的缓冲液都被除去（无液体的紧实珠体积应为 10μl）。
6. 在洗涤（步骤 5）刚开始前或刚结束后混合下列成分以配制激酶反应混合物：

   KB 27μl

   2mg/ml GST-MAPK 底物 2μl

   1mmol/L ATP 1μl

   10mCi/ml［γ-^{32}P］ATP 0.5μl。
7. 将 30μl 激酶反应混合物加入到 10μl 由步骤 5 获得的无液体的蛋白 A-琼脂糖珠中。利用加热块于 30℃孵育 30min。每 10min 轻弹管壁使内容物充分混合。最后加入 10μl 4×SDS 凝胶上样缓冲液以终止蛋白激酶反应。
8. 利用加热块于 100℃下将混合物加热 5min。脉冲离心样本以在微离心管底部收集该混合物（步骤 3），并上样到 12% SDS-PAGE 小型凝胶上（单元 12.3）。150V 电压下电泳 1h。
9. 用考马斯染料对凝胶染色 10min，然后进行脱色直至凝胶背景变得清晰。在真空中 80℃下利用干胶仪在 Whatman 3MM 滤纸上将凝胶干燥 1h。
10. 确认在每一试验中底物蛋白质的水平均相同。将磷酸化的 GST-MAPK 底物曝光在 X 射线胶片上使其显影，或者利用磷成像仪分析法对^{32}P 与底物结合进行定量。

基本方案 2　固相蛋白激酶法检测 JNK 活性

这种方法最适合于测定 JNK 活性，它依赖于 JNK 与它的靶转录因子 c-Jun 的 NH_2

末端活化区结合的特异性。

材料（带√项目见附录1）

小鼠T细胞（每个试验0.5×10^6～1.0×10^6个细胞；单元2.1）
√Triton裂解液（TLB），冰冷的
50%（V/V）的悬浮于PBS中的GST-cJun（1-79）/GSH-琼脂糖珠悬液（辅助方案，步骤1；省略后面的洗脱步骤）
√激酶缓冲液（KB）
1mmol/L ATP（Sigma；分装保存于−20℃）
10mCi/ml [γ-^{32}P] ATP（6000Ci/mmol；Amersham Pharmacia Biotech）
√4×SDS凝胶上样缓冲液
12% SDS-PAGE小型凝胶（单元12.3）
√考马斯染料
√脱色溶液
冷冻离心机
旋转式平台搅拌器
30℃和100℃加热块
Whatman 3MM滤纸

1. 4℃，1000g离心T细胞混悬液10min。弃去上清，上下吹吸使沉淀重悬于100μl冰冷的TLB中。冰上孵育15min。4℃，15 000g离心10min，将上清移至一新的1.5ml小离心管中，置于冰上。
2. 将30μl 50% GST-cJun（1-79）/GSH-琼脂糖珠悬浮液（见辅助方案，步骤9）加入1.5ml微离心管中。4℃，最高转速离心5s，收集管底沉淀。吸弃上清，加入1ml TLB洗涤。重复5s离心及吸弃上清步骤。
3. 将步骤1获得的澄清的细胞裂解液在总体积400μl的TLB中与GST-cJun（1-79）/GSH-琼脂糖珠混合，利用旋转式平台搅拌器4℃孵育过夜。
4. 次日，用步骤2中所述的方法洗涤琼脂糖珠3次，每次用1ml TLB。继续洗涤2次，每次用1ml KB。确保在最终清洗完毕后，所有多余的缓冲液都被去除（紧实的珠体积应为15μl）。
5. 在洗涤（步骤4）刚开始前或刚结束后混合下列成分以配制激酶反应混合物：
   KB 19μl
   1mmol/L ATP 1μl
   10mCi/ml [γ-^{32}P] ATP 0.5μl。
6. 将20μl激酶反应混合物加入到15μl自步骤4获得的紧实的GST-cJun（1-79）/GSH-琼脂糖珠中。利用加热块于30℃孵育30min。每10min轻弹管壁使内容物充分混合。最后加入10μl 4×SDS凝胶上样缓冲液以终止蛋白激酶反应。
7. 利用加热块于100℃将该混合物加热5min。短暂离心以在管底收集该混合物（步骤3），并将之上样到12% SDS-PAGE小型凝胶上（单元12.3）。150V电压下电泳1h。
8. 电泳后，用考马斯染料将凝胶染色10min使底物显影，然后进行脱色至凝胶背景变

清晰。在真空中80℃下利用干胶仪在Whatman 3MM滤纸上将其干燥1h。

9. 确认在每一步试验中底物蛋白质的水平均相同。将凝胶曝光在X射线胶片上使其显影或者利用磷成像仪分析法，对^{32}P掺入GST-cJun（1-79）的量进行定量。

基本方案3　SDS-PAGE后原位检测JNK蛋白激酶活性［“胶内”（IN-GEL）激酶测定］

该方案改良自Gotoh等1990年报道的方法。由于JNK对GST-cJun（1-79）具有高特异性，所以该方案最适合测定JNK活性。如果在胶中加入GST-Elk1（310-428）或MBP，该方案也适用于检测ERK的活性，但此时也能检测出其他能催化Elk1或MBP的激酶，在分析结果时应特别注意。

材料（带√项目见附录1）

小鼠T细胞（每个试验约0.5×10^6个细胞；单元2.1）
√Triton裂解液（TLB），冰冷的
GST（对照）或GST-cJun（1-79）（辅助方案）
√4×SDS凝胶上样缓冲液
20%（V/V）异丙醇/50mmol/L Tris·Cl，pH8.0（附录1）
√缓冲液A
6mol/L盐酸胍（临用前需过0.45μm滤器）
0.04%（V/V）Tween 40（Sigma）
√缓冲液B
1mmol/L ATP（Sigma；等分样本－20℃下保存）
10mCi/ml［γ-^{32}P］ATP（6000 Ci/mmol；Amersham Pharmacia Biotech）
5%（m/V）三氯乙酸（TCA）/1%（m/V）焦磷酸钠
冷冻离心机
100℃加热块
旋转式平台搅拌器
盖革计数器
Whatman 3MM滤纸

注意：有相当高比例的［γ-^{32}P］ATP并未掺入底物，仍然残留在激酶检测混合物中，因此需要作为放射性液体废物弃置处理。

1. 4℃，1000g离心T细胞混悬液10min。移出上清液，并用100μl冰冷TLB小心上下吹吸，重悬沉淀物。在冰上孵育15min，4℃，15 000g离心10min，将上清移至一新的1.5ml小离心管，置于冰上。
2. 制备12%聚丙烯酰胺小型凝胶（单元12.3），凝胶中包含0.25mg/ml GST-cJun（1-79）或GST（对照）。在应用聚合剂（TEMED）前将蛋白质加入到凝胶混合物中。
3. 将4×SDS凝胶上样缓冲液加入到自步骤1获得的T细胞裂解物中，至最终浓度为1×。利用加热块于100℃加热5min。最大速度离心5s收集管底部样本，将之上样

到步骤 3 中制备的凝胶上，150V 电压下电泳 1h（单元 12.3）。

4. 电泳后，洗涤 2 次除去凝胶中的 SDS，每次于室温下在 100ml 20%异丙醇/50mmol/L Tris · Cl（pH8.0）中孵育 30min，同时用旋转式平台搅拌器轻微摇动。再重复洗 2 次，用缓冲液 A 代替异丙醇/50mmol/L Tris。
5. 洗涤凝胶 2 次，每次于室温下在 100ml 含 6mol/L 盐酸胍（pH8.0）的缓冲液 A 中孵育 30min，并进行轻微摇动使蛋白质变性。随后在 200ml 含 0.04% Tween 40 的缓冲液 A 中 4℃温和摇动过夜，其间要更换数次（至少 4 次），从而使凝胶上的蛋白质复性。
6. 次日，将凝胶在 25ml 缓冲液 B 中室温温和摇动 30min 以进行清洗。
7. 配制蛋白激酶测定混合物：

   缓冲液 B 25ml

   1mmol/L ATP 5μl

   10mCi/ml [γ-^{52}P] ATP（6000Ci/mmol）5μl。
8. 将蛋白激酶测定混合物与凝胶于室温温和摇动，孵育 60min。
9. 用 200ml 的 5% TCA/1%焦磷酸钠于室温温和摇动清洗凝胶，其间更换数次，直到凝胶边缘的放射性与背景水平相同（用盖革计数器检测；可能需要 8～24h）。
10. 用水以漂洗凝胶数次，然后置于 Whatman 3MM 滤纸上，在真空中 80℃下利用干胶仪在 Whatman 3MM 滤纸上将其干燥 1h。通过在 X 射线胶片上曝光或者利用磷成像仪进行分析，将磷酸化的 GST-MAPK 底物显影。磷酸化条带会移往符合 JNK 异构体大小的部分（46kDa 和 55kDa）。

基本方案 4　利用磷酸化位点特异性抗体检测 MAPK 的活化

用 Biosource、Cell Signaling Technology 及 Promega 公司的抗体均可进行如下所述的检测，本方案将以 Cell Signaling Technology 的磷酸化-SAPK/JNK（Thr-183/Tyr-185）抗体为例。这一方法检测的是 MAPK 的活化作用，因此并非直接测定 MAPK 的活性。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠 T 细胞（每个试验 1.0×10^{6}个细胞；细胞分离技术见单元 2.1）

√Triton 裂解液（TLB），冰冷的

√4×SDS 凝胶上样缓冲液

12% SDS-PAGE 小型凝胶（单元 12.3）

甲醇

√Western 转膜缓冲液（WTB）

5%（*m/V*）牛血清白蛋白（BSA）或 5%（*m/V*）脱脂牛奶溶于 Western 印迹缓冲液（WBB）

一抗：多克隆兔抗磷酸化-SAPK/JNK（Thr-183/Tyr-185）抗体（Cell Signaling Technology）

0.5%（*V/V*）Tween 20 溶于 WBB

二抗：HRP-偶联的抗兔 Ig（Amersham Pharmacia Biotech）
√Western 印迹缓冲液（WBB）
冷冻离心机
100℃ 加热块
Immobilon-P 转移膜（Millipore）
凝胶印迹纸（Schleicher&Schuell）：用 WTB 浸泡
半干的 Western 转印仪（Hoefer Scientific；见单元 12.5）
旋转式平台搅拌器

1. 4℃，1000g 离心 T 细胞混悬液 10min。移出上清液，并用 100μl 冰冷 TLB 小心上下吹吸，重悬沉淀物。在冰上孵育 15min，4℃，15 000g 离心 10min，将上清移至一新的 1.5ml 小离心管，置于冰上。
2. 将 4×SDS 凝胶上样缓冲液加入到自步骤 1 获得的 T 细胞裂解物中，最终浓度为 1×。利用加热块 100℃ 加热 5min。最大速度短暂离心 5s 收集管底样本，上样到 12% SDS-PAGE 小型凝胶上，150V 电压下电泳 1h（单元 12.3）。电泳后，用 WTB 浸泡凝胶 5min。
3. 将凝胶样大小的 Immobilon-P 转移膜浸入甲醇中数秒使之浸湿，然后移入 WTB 中浸泡 5min。将凝胶和转移膜夹在两张凝胶印迹纸中间，开始免疫印迹转移。转移过程利用半干的转印仪器（单元 12.5）进行，在 15V 下转膜 3h。
4. 根据抗体类型不同，用 100ml 5%BSA/WBB 或 5%脱脂牛奶/WBB（取决于经验）在摇摆式平台上室温温和摇动，孵育 1h 对膜进行封闭。
5. 用 5% BSA/WBB 或 5%脱脂牛奶/WBB 配制适当稀释度的一抗（稀释度主要取决于经验，多采用 1∶1000）。将膜在稀释后的抗体液中 4℃ 温和摇动下孵育过夜。次日，洗膜 2 次，每次在 100ml 0.5% Tween 20/WBB 中洗 10min，同样利用摇摆式平台在室温下温和摇动。
6. 用 5% BSA/WBB 或 5%脱脂牛奶/WBB 配制 1∶10 000 稀释的二抗。将膜在二抗稀释液中室温温和摇动孵育 1h。洗膜 4 次，每次在 100ml 0.5% Tween 20/WBB 中洗 10min，同样利用摇摆式平台在室温下温和摇动。然后单独用 WBB 冲洗 5min。
7. 利用 ECL 试剂按照说明书（同时见单元 12.5）进行免疫印迹。利用 X 射线胶片显影适当时间来探测信号。例如，最初曝光显影 30s～1min 来确定信号的强度，再据此进行二次曝光显影。

辅助方案　制备 GST-MAPK 底物融合蛋白

GST-Elk1（310-428）用作 ERK 的底物、GST-cJun（1-79）用作 JNK 的底物、GST-ATF2（1-109）用作 p38 的底物。

材料（带√项目见附录 1）

感受态的 *E. coli*（BL21；Novagen）
编码GST-MAPK 底物融合蛋白的质粒 DNA（来自 Roger. Davis@Umassmed. edu 或 Alan. J. Whitmarsh@man. ac. uk，或类似质粒），或纯化的 cJun 和 ATF

(Santa Cruz Biotechnology 或 Upstate Biotechnology)

含有100μg/ml 氨苄青霉素(Sigma;储存液为 100mg/ml 水溶液,分装保存于 −20℃)的 LB 培养基(附录 1)

100mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳吡喃糖苷(IPTG;Promega;分装保存于−20℃)

√缓冲液 X 含或不含蛋白酶抑制剂,冰冷的

Triton X-100(Sigma)

30%(*m*/*V*)谷胱甘肽(GSH)-Sepharose 4B 填充物(Amersham-Pharmacia)

√PBS

蛋白质浓度测定试剂盒(Bio-Rad;可选)

100mmol/L HEPES,pH8.0

50 mmol/L 谷胱甘肽(Sigma)/ 100mmol/L HEPES,pH8.0

√缓冲液 D

液氮或干冰

250ml 和 2L 的锥形瓶

细菌振荡培养床

分光光度计

冷冻离心机

探头式超声破碎器(如 Branson)

50ml 圆锥底离心管

旋转式搅拌器

2ml 聚丙烯层析柱(Qiagen)

12kDa MWCO 透析膜

1. 通过 $CaCl_2$/热激(Sambrook *et al*.,1989)或电穿孔的方法,用编码 GST-MAPK 底物融合蛋白的质粒 DNA 转化 BL21 *E. coli* 感受态细菌。
2. 将转化细菌的单个克隆接种于 250ml 锥形烧瓶中的含 100μg/ml 氨苄青霉素的 50ml LB 培养基中,置于 37℃振荡培养过夜。
3. 将过夜培养物移至一个 2L 锥形烧瓶中,培养体积稀释至 1L,氨苄青霉素浓度仍为 100μg/ml。置于 37℃振荡培养 2~3h 至 OD_{600} 达到 0.7。加入 100mmol/L 的 IPTG 原液至终浓度达到 0.1mmol/L,置于 37℃振荡培养 2h。
4. 4℃,1500*g* 离心 10min 收集菌体,弃上清。用 40ml 冰冷的缓冲液 X(不含蛋白酶抑制剂)洗涤细胞。再次 1500*g* 转速离心并弃上清。如果有必要,沉淀可于−80℃保存数周。
5. 如果沉淀已被冷冻,需在冰上解冻。然后用 40ml 冰冷的缓冲液 X(含蛋白酶抑制剂)用移液管小心地上下吹吸使之重悬。
6. 利用超声破碎细胞,脉冲为 30s,共 4 次。整个过程中细胞均置于冰上,两次脉冲间隔 1min。在超声裂解产物中加入 Triton X-100 至其终浓度达到 1%(*V*/*V*),温和涡旋混匀,置于冰上 20min。4℃,20 000*g* 离心 20min,使不溶的部分沉淀。
7. 加入 2ml 50% GSH-Sepharose 4B 混悬物(由制造商提供)到 50ml 锥底离心管中。4℃,1000*g* 离心 1min,弃上清。加入 30ml 冰冷的缓冲液 X(含蛋白酶抑制剂),混

匀，再次 4℃，1000*g* 离心 1min，弃上清。将步骤 6 中所得的上清移至含 GSH-Sepharose 的 50ml 锥底离心管中，在旋转式搅拌器中 4℃孵育 1h。

8. 4℃，1000*g* 离心 1min，弃上清。洗 4 次，每次加入 30ml 冰冷的缓冲液 X（含蛋白酶抑制剂），4℃，1000*g* 离心 1min，弃上清。
9. 制备 GST-cJun（1-79）/GSH-Sepharose 珠：用 30ml PBS 冲洗珠子 1 次并使之在同样体积的 PBS 中重悬。可于 4℃保存至数周。

   如果要从 GSH-Sepharose 珠上洗脱 GST 融合蛋白，则省略此步骤。
10. 分析 GST-cJun（1-79）/GSH-Sepharose 珠的部分组分以测定蛋白质浓度（用蛋白质测定试剂盒）。或者，行 SDS-PAGE（单元 12.3）后用考马斯染色（单元 12.4），并与已知浓度的蛋白质相比较。
11. 将 Sepharose 珠转移至 2ml 聚丙烯层析柱，用 5ml 冰冷的缓冲液 X 以重力的作用通过层析柱以冲洗 Sepharose 珠。再用 2ml 100mmol/L HEPES，pH8.0，流过层析柱进行洗涤。
12. 加 50mmol/L 谷胱甘肽/100mmol/L HEPES，pH8.0，将 GST 融合蛋白从柱子上的 Sepharose 珠上洗脱。收集每份 0.5ml 的洗脱液至 1.5ml 微量离心管内。
13. 使用蛋白质浓度检测试剂盒测定步骤 12 的洗脱液的浓度 。收集主要含有目的蛋白的洗脱液。
14. 用 12-kDa MWCO 透析膜，4L 缓冲液 D 对洗脱组分进行透析，在 4℃下用磁性搅拌器低速搅拌过夜。对透析的蛋白质进行 SDS-PAGE 分析（单元 12.3）和考马斯染色（单元 12.4）以测定蛋白质的产量和纯度。也可以根据已知蛋白质样品的浓度评估未知蛋白质的浓度。
15. 用液氮或干冰对纯化的 GST 融合蛋白组分进行快速冷冻，保存于－80℃。

    在基本方案 1 里，冷冻前可用缓冲液 D 进行稀释或者用离心式浓缩器（如 Nanosep 10K，Pall）进行浓缩，使样本浓度调整到 2mg/ml 待用。

参考文献：Bou *et al.*，2003；Gotoh *et al.*，1990；Hibi *et al.*，1993；Kyriakis and Avurch，2001；Smith and Johnson，1988；Whitmarch and Davis，1998

撰 稿 人：Alan J. Whitmarch and Roger J. Davis

单元 3.6　脂筏的分离和应用

在免疫学中脂筏是很重要的，因为 T 细胞受体和几个其他重要的 T 细胞信号转导蛋白均存在于脂筏中，或者在转导信号时被募集到脂筏中。与此相似，嗜碱粒细胞上高亲和力 IgE 受体在转导信号时也被募集到脂筏中。

基本方案　通过蔗糖梯度浮选法制备去污剂抗性的膜并通过免疫印迹对蛋白质进行分析

材料（带√项目见附录 1）

细胞，贴壁或非贴壁

√TNE/P 缓冲液，单独或包含以下一种或多种组分：
　　1%、2%或 5%（V/V）Triton X-100
　　0.1mol/L 碳酸钠，pH11
　　5%、35%或 80%（m/V）蔗糖
　　60mmol/L 辛基葡糖苷
√TNE 缓冲液
去污剂相容的蛋白质检测试剂盒（如 Bio-Rad）
√2×或 6×SDS/样品缓冲液
丙酮（可选），冰冷的
乙醚（可选）
10cm 的组织培养皿（用于贴壁细胞）
22G 针头
1ml 和 5ml 的注射器
SW41 转子和超速离心管（Beckman）

对于贴壁细胞，无需进行比较的细胞系

1a. 将细胞铺于 2 个 10cm 组织培养皿中，生长至细胞汇合。对于 DRM 脂质分析（见辅助方案 3），则接种细胞至 5 个培养皿或 10 个培养皿以定量磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇或含量稀少的神经节苷脂。
2a. 用 1ml 含有 1%或 2% Triton X-100 的 TNE/P 缓冲液置冰上裂解细胞 20min。如果有必要，在裂解缓冲液中加入 0.1mol/L 碳酸钠，pH11，以便更好地定量 DRM 脂类得率，提高 DRM 脂质得率，或减少外周或细胞骨架蛋白与 DRM 的结合。在分析 DRM 中的酶活性时，不能使用碳酸盐。
3a. 用细胞刮或橡皮刮将培养皿细胞裂解物刮下来，收于管中。
4a. 如果溶解缓冲液含有碳酸盐，将裂解液通过带 22G 针头的 5ml 注射器 10 次（保持裂解产物低温）用于剪切 DNA，以确保 DRM 移至正确的梯度。

对于贴壁细胞，细胞间需进行比较的细胞系

1b. 如需比较两个不同的细胞类型间 DRM 的丰度和得率，按照步骤 1a 所示用培养皿培养不同细胞类型的细胞，对每种细胞另接种一个培养皿（以测定培养物的蛋白质含量），确保每个培养皿的细胞数相同。
2b. 用 5ml TNE 缓冲液漂洗每种类型细胞的一个培养皿 2 次，用 1ml 含有 1% Triton X-100 或者 0.1mol/L 碳酸钠的 TNE/P 缓冲液裂解细胞。将黏稠的细胞裂解物立即转移至 1.5ml 微量离心管内，并通过 22G 针头连接的 1ml 注射器 10 次（或直到黏滞性消失）以剪切 DNA。然后以最大速度离心。
3b. 用去污剂相容的蛋白质检测试剂盒测定 5～10μl 等份裂解物的蛋白质含量。将 TNE 缓冲液与含有 2%或 5%Triton X-100 的 TNE 缓冲液混合，来制备含有足量 Triton X-100 的 TNE/P 缓冲液，使用去污剂：蛋白质为 10：1（m/m）混合。为增加与脂筏结合较弱蛋白质的得率，使用去污剂：蛋白质为 2：5（m/m）混合。

4b. 加入 1ml 含有 1% Triton X-100 的冰冷 TNE/P 缓冲液至剩余的培养皿中，在冰上裂解细胞 20min，在裂解缓冲液中加入 0.1mol/L 碳酸钠，pH11，以便更好地定量 DRM 脂类得率，提高 DRM 脂质得率，或减少外周或细胞骨架蛋白与 DRM 的结合。在分析 DRM 中的酶活性时，不能使用碳酸盐。按照步骤 3a 所示操作；如果有必要，按照步骤 4a 所示操作。

对于非贴壁细胞

1c. 培养约 5×10^7 个细胞，并 4℃，200g 离心 5min。如需进行细胞间的比较时，应使细胞（来源相同）数量相同。对于脂类分析（见辅助方案 3），使用 2×10^8 的非贴壁细胞。
2c. 用 5ml 冰浴的 TNE 缓冲液重悬细胞，重复洗 2 次。
3c. 用 2ml 含有 1%的 Triton X-100 的 TNE/P 缓冲液在冰上裂解细胞 20min。在裂解缓冲液中加入 0.1mol/L 碳酸钠，pH11，以便更好地定量 DRM 脂类得率，提高 DRM 脂质得率，或减少外周或细胞骨架蛋白与 DRM 的结合。在分析 DRM 中的酶活性时，不能使用碳酸盐。
4c. 如果有必要，按照步骤 4a 进行操作。
5. 将裂解产物与含有 80%蔗糖的冰冷 TNE/P 缓冲液混合。对于来自贴壁细胞的裂解物，需要上述加至培养皿中的裂解缓冲液总体积为 1.25 倍体积（即对于步骤 3a 或 4b 收集的裂解物，加 1.25ml）。对于非贴壁细胞的裂解物，加 2.5ml。完全混合并静置几分钟以便减少泡沫。
6. 转移至一个或多个 SW41 超速离心管内，移去可能存在的泡沫。每管不超过 5ml。用冰冷的含有 35%蔗糖的 TNE/P 缓冲液 6～7ml 小心地覆盖到裂解物/蔗糖复合物上（分层应尽可能的宽），开始倒入液体时应注意观察以确保其可以浮在上层。如果没有浮起，则从微量离心管中移去混合物，并彻底混合。如果必要的话，加入少量的 80%蔗糖。
7. 用含 5%蔗糖的冰冷 TNE/P 缓冲液填充离心管至距离顶端约 3mm。配平，4℃，100 000g 离心≥3h（至 24h）。

蛋白质梯度分布的检测

8a. 从底端分段收集梯度上的成分，每份收集 1ml。加 2×或 6×SDS/样品缓冲液，通过 SDS-PAGE（单元 12.3）和免疫印迹法（单元 12.5）分析其中 50～100μl 组分。

对于无需免疫沉淀的免疫印迹

8b. 用 5ml 注射器 22G 针头从离心管的顶端在 5%/35%蔗糖交界处收集可见的条带置于 1 个 SW41 超速离心管中。用冰冷的 TNE/P 缓冲液稀释该膜成分，直到注满离心管。4℃，100 000*g* 离心 1h。
9b. 移弃上清液。用 100～200μl TNE/P 缓冲液移出沉淀物并移至一微量离心管内。用 200μl TNE/P 缓冲液清洗超离心管 3 次，刮擦管底部以收集沉淀物碎片。将这些清洗液与沉淀物合并。
10b. 4℃，最高转速离心 10min 以沉淀 DRM。弃上清液。直接用 2×或 6×SDS/样品缓冲液溶解 DRM，通过 SDS-PAGE（单元 12.3）和免疫印迹（单元 12.5）进行分析。

对于低分子质量蛋白质

8c. 依步骤 8b～10b 制备 DRM 沉淀物，不用 SDS/样品缓冲液来溶解。加 1ml 冰冷的丙酮至 DRM 沉淀物里，涡旋混匀，置冰上孵育 10min。4℃，最高转速离心 10min，移弃丙酮。

9c. 在室温下加 1ml 二乙基醚至管内，涡旋混匀，如上述操作进行沉淀。移去醚并风干。用 2×或 6×SDS/样品缓冲液溶解 DRM 蛋白，以 SDS-PAGE（单元 12.3）和免疫印迹法（单元 12.5）进行分析。

免疫沉淀后的免疫印迹

8d. 依照步骤 8b～10b 制备 DRM 沉淀物，不用 SDS/样品缓冲液来溶解。用 1ml 含有 1% Triton X-100 的 TNE/P 缓冲液溶解 DRM，置 37℃孵育 5min，或者加入 1ml 含有 60mmol/L 辛（烷）基葡糖苷的 TNE/P 缓冲液，置冰上孵育 20min。

9d. 4℃，最高转速离心 5min，以沉淀任何残存的不溶性物质。将澄清的可溶性 DRM 移至新管，通过免疫共沉淀试验（单元 12.2）回收目的蛋白，以 SDS-PAGE（单元 12.3）和免疫印迹法（单元 12.5）进行分析。

备选方案　用离心法制备去污剂抗性的膜

相比蔗糖梯度离心分离 DRM 的方法，此方法速度较快，而且可以测定 DRM 蛋白是否溶于 Triton X-100。值得注意的是 SDS-可溶性组分中大部分是细胞骨架，而辛（烷）基葡萄糖苷-可溶性组分大部分是 DRM 蛋白。应该用 SDS 溶解那些稳定的、经短时间暴露于 1% SDS 后仍可复性的蛋白质。因为反应体积小，此方法适用于研究 DRM 与放射标记蛋白的相互作用（如利用脉冲追踪试验；见辅助方案 1），或进行免疫印迹分析。此操作的不利之处是不能从高密度的蛋白质复合体，如细胞骨架和核残余物里分离出低密度的 DRM。

附加材料（其他材料见基本方案；带√项目见附录 1）

√沉淀物裂解液
√20%（*m*/*V*）SDS
35mm 组织培养皿（贴壁细胞使用）

1a. 贴壁细胞：细胞接种于 35mm 组织培养皿中直至细胞连片生长，而后用 1ml 冰冷的 TNE 缓冲液洗涤，置于冰上。如果有必要，对蛋白质进行放射性标记（见辅助方案 1）。

1b. 非贴壁细胞：用 5ml 冰冷的 TNE 缓冲液冲洗约 5×10^{6} 个细胞/ml 的细胞。4℃，200*g* 离心 5min。移去缓冲液并置于冰上。如果有必要，对蛋白质进行放射性标记（见辅助方案 1）。

2. 用 1ml 含有 1% Triton X-100 的冰冷 TNE/P 缓冲液于冰上裂解细胞 20min。对于贴壁细胞，将刮下的裂解产物置于微量离心管内。4℃，最高转速离心 5min。将上清液移至新管，同时保留沉淀。

在 SDS 中的溶解

3a. 用 100μl 沉淀物裂解液重悬 Triton X-100 的裂解沉淀。使混合物通过带 22G 针头的 1ml 注射器（以剪切 DNA）至均一。用 1ml 包含 1% Triton X-100 的冰冷 TNE/P 缓冲液进行稀释，4℃，最大速度离心 2min，保留上清，弃去剩余的不溶性物质。

4a. 为了进行 2 个组分的比较，用 20% 的 SDS 储存液将初始的 Triton X-100 上清液（步骤 2）调整至终浓度 0.1% SDS。用免疫共沉淀（单元 12.2）、SDS-PAGE（单元 12.3）和免疫印迹（单元 12.5）对等量的 2 个组分进行分析。

在辛基葡糖苷中的溶解

3b. 用 1ml 含有 60mmol/L 辛基葡糖苷的冰冷的 TNE/P 缓冲液于冰上重悬 Triton X-100 裂解沉淀 20min，以便溶解 DRM 蛋白。涡旋混匀，4℃，最高速度离心 2min，保留上清液并弃去沉淀。

4b. 通过免疫沉淀（单元 12.2）、SDS-PAGE（单元 12.3）和免疫印迹（单元 12.5）等方法，对等量的该组分及原始的 Triton X-100 裂解上清（步骤 2）进行分析。

辅助方案 1　脉冲追踪方法分析去污剂抗性的膜蛋白

该方法是免疫印迹法的替代方法，用于确定通过分泌途径转运的某种蛋白质何时开始与 DRM 结合。

附加材料（其他材料见备选方案）

无甲硫氨酸、包含透析血清的培养基（透析血清方法见附录 1；用量取决于细胞类型）

[^{35}S] 甲硫氨酸

未标记的甲硫氨酸

1. 用无甲硫氨酸、包含透析血清的培养基将 35mm 组织培养皿中的细胞饥饿 20min。对于非贴壁细胞，起始细胞量为 5×10^6 个细胞。
2. 细胞在 100μm 无甲硫氨酸、包含透析血清、并加入浓度至 1mCi/ml [^{35}S] 甲硫氨酸的培养基中孵育 5～20min。在含有血清和 5mmol/L 非标记甲硫氨酸的常规培养基中追踪所需要的时间。
3. 使用 SDS 或者辛基葡萄糖苷（见备选方案）通过离心分离和溶解方法制备 DRM。通过免疫共沉淀（单元 12.2）从 Triton 可溶性和 Triton 不溶性组分中获得目的蛋白，并通过 SDS-PAGE（单元 12.3）和放射自显影法进行分析。

辅助方案 2　通过放射性标记检测去污剂抗性的膜蛋白的全部组分

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

√PBS，无菌

无甲硫氨酸、包含透析血清的培养基（透析血清方法见附录 1；用量取决于细胞类型）

[^{35}S] 甲硫氨酸

1. 在 10cm 组织培养皿里接种贴壁细胞。如果有必要，将待测细胞接种于两个培养皿里，但是只对其中一个培养皿进行标记（对于非贴壁细胞，接种 5×10^6 个细胞，离

心和裂解方法可见基本方案）。用 5ml 无菌 PBS 冲洗一个培养皿里的细胞。加入以下物质：

4.5ml 包含透析血清但无甲硫氨酸的培养基

0.5ml 含有透析血清的常规生长培养基

[^{35}S] 甲硫氨酸至 50μCi/ml。

2. 在组织培养箱里孵育过夜（约 16h）。移去有放射性的培养基，并用 5ml PBS 洗 2 次。用 Triton X-100 制备细胞的裂解物（见基本方案，步骤 2a 和 3a）。如果有必要，将经过放射标记的裂解物与未标记细胞的裂解物合并待用。
3. 如前所述，通过蔗糖梯度浮选法制备 DRM，并准备进行 SDS-PAGE 检测（见基本方案，步骤 5～7 和步骤 8b～10b 或步骤 8c～9c）。SDS-PAGE 电泳（单元 12.3）后，用放射自显影法显影。

辅助方案 3 定量高效薄层色谱法（HP-TLC）进行 DRM 脂质分析

材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

甲醇

氯仿

1∶1 和 2∶1（V/V）氯仿/甲醇

溶剂 A：30∶60∶8（$V/V/V$）氯仿/甲醇/水

硅烷化试剂（Sigmacote，Sigma）

DEAE 葡聚糖凝胶（Sephadex）混悬物（见辅助方案 4）

溶剂 B：30∶60∶8（$V/V/V$）氯仿/甲醇/0.8mol/L 乙酸钠

8∶4∶3 氯仿/甲醇/0.1mol/L 氯化钠

0.1mol/L 氯化钠

溶剂 C：3∶48∶47（$V/V/V$）氯仿/甲醇/0.1mol/L 氯化钠

溶剂 D：3∶48∶47（$V/V/V$）氯仿/甲醇/水

氮气

反相 C 18 柱（见辅助方案 5）

√中性脂质标准品

√酸性脂质标准品

乙酸

甲酸

己烷

异丙醚

√脂类显影试剂

SW28 转子和超速离心管（Beckman）

带 Teflon 内衬盖子的 15ml 玻璃管

大功率（Laboratory Supplies，型号 GSP1T）或标准浴槽型超声破碎仪

24mm Whatman GF/C 玻璃纤维滤器

过滤设备：玻璃微量分析过滤装置（Fisher），或以橡胶垫圈插入 125ml 侧臂烧瓶的 24mm Buchner 漏斗

带磨口玻璃瓶颈的 125ml 平底烧瓶和管子

旋转蒸发器

玻璃棉

一次性 10ml 宽口玻璃移液管

玻璃棒

10ml 硅烷化移液管

5ml 带 Teflon 内衬盖子的锥形玻璃管

带单孔瓶塞的 125ml 侧臂烧瓶

无荧光指示剂的 10cm×20cm 高效薄层色谱（HP-TLC）板（Merck）

带玻璃盖的薄层色谱缸

预热至 100℃、110℃、180℃的烤箱

改良的 10μl Hamilton 注射器：带有斜切边缘的注射器，可将上样角度减少一半，有利于少量滴剂的上样

带磨口玻璃塞的 100ml 刻度量筒

剪成色谱缸大小的吸水纸

有冷却装置的吹风机

0.5～1cm 厚铝块

光密度计

注：所有接触 DEAE 葡聚糖凝胶的玻璃制品使用前均要硅烷化处理。玻璃棉装好后，把玻璃棉和柱子一同进行硅烷化处理。

1. 准备 10 瓶 10cm 培养皿贴壁细胞的裂解产物（见基本方案，步骤 1a～4a）或者 2×10^8个的非贴壁细胞的裂解产物（见基本方案，步骤 1c～4c）。
2. 利用蔗糖梯度浮选法制备 DRM（见基本方案，步骤 5～7）。从交界面处获取并离心收集 DRM（见基本方案，步骤 8b～10b），使用 SW28 而不用 SW41 转子并且按比例增加体积。
3. DRM 沉淀中加入 1ml 甲醇，剧烈振荡至沉淀悬起，移入带有 Teflon 内衬盖子的 15ml 玻璃管中。用 1ml 甲醇洗 2 次，将每一次的洗液合并入原管。再加入 3ml 氯仿，随后加入 6ml 1∶1（V/V）甲醇和氯仿混合物。
4. 应用高强度浴槽型超声破碎仪（推荐使用）或者标准超声破碎仪处理几秒。室温振荡孵育过夜。在真空中用 24mm Whatman GF/C 玻璃纤维滤器过滤到 125ml 侧臂烧瓶中。
5. 用 10ml 1∶1（V/V）甲醇和氯仿溶液冲洗过滤器。将溶液倒入一个适用于旋转蒸发器的带磨口玻璃瓶颈的 125ml 平底烧瓶中，用旋转蒸发器干燥。置 5ml 溶剂 A 中溶解脂质。
6. 用玻璃棒将一小卷玻璃棉塞到一个 10ml 宽口玻璃移液管的尖端。把柱子装在环状支架连接或者用夹子夹住。将 2ml 硅烷化试剂注入移液管和玻璃棉。5ml 甲醇冲洗并且确保玻璃棉没有沾在移液管内侧壁上。
7. 用一只 10ml 硅烷化移液管，向柱内加入足够量的 DEAE 葡聚糖凝胶以形成一个 2ml 柱床。用 10 倍柱体积的溶剂 A 填塞柱子。用巴氏移液管将溶解的脂质上柱。用 10 倍柱体

积的溶剂 A 冲洗柱子，将中和的脂质收集至一个带有磨口玻璃瓶颈的 125ml 平底管中。

8. 用 10 倍柱体积的溶剂 B 冲洗柱子，将酸性脂质收集至一个带磨口玻璃瓶颈的 125ml 平底管中。弃去该柱。测定酸性脂质的体积，在旋转蒸发器上干燥两种组分。
9. 用 1.5ml 8∶4∶3 氯仿/甲醇/0.1mol/L 氯化钠溶解中性脂质，会产生两相。移入一个带有 Teflon 内衬盖子的 5ml 锥形玻璃管中，1.5ml 上述溶液冲洗瓶子一次并将冲洗液倒入 5ml 管中，用 1.2ml 2∶1（*V*/*V*）氯仿/甲醇冲洗瓶子将冲洗液倒入 5ml 管中，随后加入 0.3ml 0.1mol/L NaCl。室温，800*g* 离心 5min。
10. 标记管内液体顶端，移去上层相，加入溶剂 C 到标记处。如前述振荡并离心。移去上层相，小心将溶剂 D 铺到标记处。小心操作，避免破坏有机相。移去上层相，加入新鲜的溶剂 D，室温孵育 10min。移去并丢弃上层相。在氮气流中风干有机物层。
11. 加入与蒸干前测定的等体积水溶解酸性脂质。将一个反向 C18 柱插在一个与真空装置相连的 125ml 侧臂瓶上的单孔塞中。于真空中将酸性脂质注入该柱 3 次。用 20～30ml 水冲洗该柱。
12. 先用 5ml 甲醇，接着用 35ml 1∶2（*V*/*V*）氯仿/甲醇将脂质洗脱入一个干净的带磨口玻璃瓶颈的 125ml 平底管中。加水后不要立即加入氯仿/甲醇溶液。
13. 于旋转蒸发器上蒸干脂质。向瓶内加入 1ml 1∶2（*V*/*V*）氯仿/甲醇，摇匀并超声几秒钟以溶解脂质。一个带有 Teflon 内衬盖子的 5ml 锥形玻璃管中，用 1ml 1∶2（*V*/*V*）氯仿/甲醇冲洗该瓶 2 次并将冲洗液倒入 5ml 管中。在氮气流下干燥脂质。
14. 将 10cm×20cm HP-TLC 板边缘的所有硅胶刮除。在 TLC 缸中，用含有 60ml 氯仿、35ml 甲醇和 8ml 水的液体预洗该板，进行层析直至溶剂到达托盘短边的板顶端。用铅笔标记板的顶端以便在随后的步骤中了解板的方向。
15. 该板在使用前在烤箱内加热至 110℃，持续 15min 使之活化（即去除水蒸气）。用铅笔标记该板为加入脂质做参考（图 3.6.1）。准备在距离板底端 1cm 处点样（起始线），样品与板的边缘留出 1cm（最多达 18 个样品）。为每个样品预留 5mm 宽的带，样品间距 5mm。在上样处用铅笔画点，同时在距板子底端 6cm 处做标记。

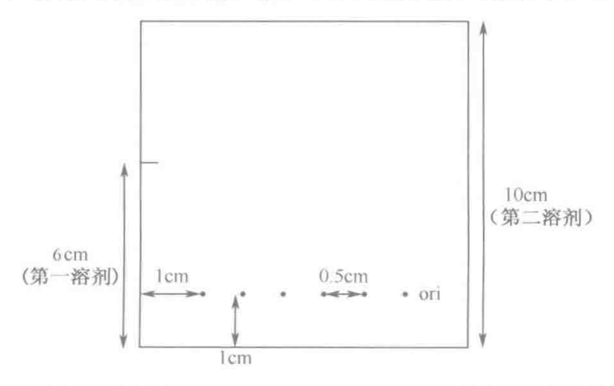


图 3.6.1　辅助方案 3 中所述 HP-TLC 板的规划图。起始线（ori）用软质铅笔标记为点，距板底部 1cm，每点之间距离 5mm。第一点和最后一点距离板的边缘 1cm。样品点在两点之间点样形成 5mm 的一条，样品之间距离 5mm。第一溶剂体系泳动到距离板底部 6cm 的标记处，第二溶剂体系泳动 10cm（板的顶端）。

16. 用1∶1（V/V）氯仿/甲醇溶解脂质。调整每个样品的浓度，预计上样量为5～20μl（每种脂质含量在1～7μg）。试验几种浓度以确保有一种浓度在标准曲线范围内。
17. 用改良的10μl Hamilton注射器上第一个样品，在起始线的两个点之间点入一系列扩散至5mm宽的极小液滴。使溶剂短暂干燥后接着在前一样品上点入更小的液滴，持续点样直至所需的上样量。
18. 将剩余样品上样，并选取合适的中性或酸性脂类对照，上样5μl（含1～7μg脂质），将平板室温干燥5min。临用前在带磨口玻璃塞的100ml量筒中配制70.8ml溶剂I：42ml氯仿、18ml甲醇、7.2ml乙酸、2.4ml甲酸和1.2ml蒸馏水。
19. 在TLC缸中加入溶剂和吸水纸，使吸水纸饱和，立即以玻片盖住并以重物（如两个装满液体的4L水罐）压住防止挥发。将点有样品的TLC平板放于TLC缸中，使起始位置处在缸底部，立即盖上并压上重物。
20. 溶剂前沿泳动至距离平板底部6cm（到达事先用铅笔标记的位置）时，从缸中取出平板，风干15～30min。如果有必要也可用电吹风的冷风吹干。溶剂挥发期间可同时在带磨口玻璃塞的100ml量筒中配制102ml的溶剂体系II：65ml己烷、35ml异丙醚和2ml乙酸。
21. 在另一个TLC缸中加入溶剂和吸水纸，使吸水纸饱和，立即盖住防止挥发。当第一溶剂挥发后，将点有样品的TLC平板放于TLC缸中。泳动至溶剂前沿到达平板顶部（10cm）。从缸中取出平板，风干15～30min。将用过的溶剂丢弃，吸水纸彻底风干留作再次使用（可重复使用若干次）。
22. 将平板浸于脂类显影试剂中，或者在通风橱中将该液体喷于板上，使其湿透。将其竖起流干液体至板的光泽淡去。
23. 将平板置于预热100℃的烤箱中烘干1～2min，待其颜色改变之前取出，然后放置于另一180℃烘箱中的0.5～1.0cm厚铝块上干燥5～10min，至颜色充分显现但尚未出现背景颜色时取出，冷却待用，如需要保存（可达24h），则应以旧的TLC平板（其上硅胶均已去除）覆盖，用塑料膜包裹住，保存于－20℃。
24. 在24h内以密度仪扫描色带，利用中性或酸性脂质标准品绘制标准曲线，将样品与适当的标准曲线进行比对测定。

辅助方案4　DEAE葡聚糖凝胶的制备

材料

DEAE葡聚糖凝胶A-25
1mol/L NaOH
0.5mol/L乙酸：将57.5ml的冰乙酸稀释于2L水中
甲醇
溶剂A：30∶60∶8（V/V/V）氯仿/甲醇/水
4L侧臂烧瓶
带滤纸的布氏漏斗（直径18.5cm）
250ml试剂瓶（带磨口玻璃塞或带Teflon内衬螺旋瓶盖）

注：所有接触 DEAE 葡聚糖凝胶的玻璃器皿在使用前均应在硅烷化试剂（Sigmacote；Sigma 公司提供）中进行短暂漂洗。

1. 将 100gDEAE 葡聚糖凝胶 A-25 重悬于盛有蒸馏水的 4L 侧臂烧瓶中，室温静置 1h。
2. 加入 1L 1mol/L NaOH 摇匀数次，室温静置 1h 后，弃去上清。
3. 边摇匀边加水，尽量充满整个烧瓶，静置 15～20min 使树脂沉淀，弃去上清。
4. 重复步骤 3，将树脂沉淀倒入带滤纸的直径 18.5cm 的布氏漏斗中。于真空中以 4L 水冲洗至滤液 pH 为 6.5 为止。再把树脂沉淀移回浸洗后的原 4L 烧瓶中，加入 2L 0.5mol/L 的乙酸摇匀数次，室温静置 30min 后，弃去上清液。重复步骤 3 的水洗步骤共 3 次。
5. 再次把树脂沉淀倒入更换好滤纸的布氏漏斗中，于真空中以约 10L 的水冲洗，至滤液的 pH 为 4.5～5 为止。如有必要，可将密闭的布氏漏斗储存于 4℃的水中保存数天。
6. 再次把树脂沉淀移回浸洗后的原 4L 烧瓶中，重复步骤 2～5，所不同的是步骤 4 中静置 30min 改为 1.5h。
7. 关闭真空泵，向漏斗中的树脂中加入甲醇，用药匙轻轻搅拌混匀。小心操作，以免移动滤纸。让甲醇以重力作用自然流下至无液体滴下，但不要让树脂沉淀变干。
8. 用漏斗和药匙将树脂沉淀移至带磨口玻璃塞或带 Teflon 内衬螺旋瓶盖的 250ml 试剂瓶中。如树脂开始变干时可加入溶剂 A。
9. 加入溶剂 A 至约 2/3 瓶容积，摇匀数次，室温静置过夜，倒去或吸去上清。
10. 重复步骤 9，但仅室温静置 20min 使树脂沉淀，倒去或吸去上清。估计瓶中树脂的体积，加入等体积的溶剂 A，室温可保存至一年。

辅助方案 5　C18 反相色谱柱的制备

材料

C18 反相颗粒硅（Millipore）
1∶2（V/V）氯仿/甲醇
甲醇
玻璃棉
5ml 一次性玻璃移液管
125ml 的带单孔塞的侧臂烧瓶
1ml 的一次性玻璃瓶

1. 在一个 5ml 一次性玻璃移液管中填入少量的玻璃棉。倒入反相 C18 颗粒硅形成 1.5ml 的柱床。再在上面放置一小片玻璃棉。
2. 将移液管置于 125ml 侧臂烧瓶的带单孔塞上，连接上真空吸引器。用 35ml 的 1∶2（V/V）氯仿/甲醇洗涤，接着用 5ml 甲醇洗涤，最后用 10～20ml 的水洗涤，均在真空下进行。
3. 每次使用前，重复上述洗涤步骤以去除游离的 C18。注意洗涤时不能在加水后直接加入含氯仿的有机溶剂。干燥状态下可保存至一年，并可反复使用达 10 次。

辅助方案 6　用甲基-β-环式糊精去除胆固醇来破坏脂筏

胆固醇可以大大促进脂筏的形成，因而去除胆固醇至少能破坏部分脂筏。

附加材料（其他材料见基本方案；带√项目见附录 1）

√PBS

预热的无血清培养基，含或不含 10mmol/L 甲基-β-环式糊精（MBCD，Sigma）和 1mg/ml BSA

缓冲盐溶液（BSS，见附录 1），含及不含 10mmol/L 甲基-β-环式糊精和 1mg/ml BSA

对于贴壁细胞

1a. 铺细胞于 10cm 培养皿中，待汇合生长到 70%～90%时，用 PBS 洗两遍。加入 2.5ml 预热的含 10mmol/L 甲基-β-环式糊精和 1mg/ml BSA 的无血清培养基。

细胞的长满程度对胆固醇的去除效果有很大影响，应在不同批次的实验中严格控制保持一致。

2a. 置 37℃孵育 15～60min（根据辅助方案 7 来优化孵育时间）。移去培养基，用无血清培养基洗 2 次。加入 10ml 的无血清培养基后即可以进行所需的细胞功能测定。

孵育期间培养皿的振荡会强烈影响胆固醇的去除效果，应在不同批次的实验中严格控制保持一致。

对于非贴壁细胞

1b. 用 BSS 洗细胞 2 遍。用含 10mmol/L 甲基-β-环式糊精和 1mg/ml BSA 的 BSS 将细胞重悬至 2×10^6～4×10^6个细胞/ml。加入 2.5ml 预热的含 10mmol/L 甲基-β-环式糊精和 1mg/ml BSA 的无血清培养基。置 37℃孵育 15～60min（根据辅助方案 7 来优化孵育时间）。

2b. 室温，225g 离心 5～10min。用 BSS 洗 2 遍。加入 10ml 的无血清培养基后即可以进行所需的细胞功能测定。

辅助方案 7　甲基-β-环式糊精（MBCD）处理去除胆固醇的动力学测定

由于 MBCD 处理法去除胆固醇的影响因素较多，需要进行预试验以确定胆固醇的去除率，随后在一致的实验条件下进行正式试验。本方案介绍了监测胆固醇去除的简便方法。或者，通过定量 HP-TLC 方法（见辅助方案 3）测定 MBCD 处理后细胞中残留胆固醇的量，然后与未处理样品进行比较。

材料（带√项目见附录 1）

60～100Ci/mmol [1,2,6,7-^{3}H（N）] 胆固醇（[^{3}H] 胆固醇）

含血清的培养基

细胞

√PBS

含 1% (m/V) BSA 的无血清培养基

√BSS，可选

含 10mmol/L MBCD (Sigma) 的无血清培养基

含 10% (V/V) Triton X-100 的 PBS

60mm 组织培养皿

液闪仪

1. 在无菌条件下加入 1～2μCi/ml [^{3}H] 胆固醇到含血清的培养基中，使溶剂浓度保持在 0.1%。置 37℃培养 12～24h 使胆固醇与血清脂蛋白达到平衡。准备 5 个 60mm 培养皿的贴壁细胞，预计在 2d 后达到汇合生长至 70%～90%，或者非贴壁细胞，预计在 2d 后达到 10×10^6 个细胞量。
2. 加入正常培养体积的含 [^{3}H] 胆固醇的培养基，培养 2d 后，去除培养基，用 PBS 洗 2 次。
3. 将细胞转移到新的 60mm 培养皿中以避免结合在塑料皿上的 [^{3}H] 胆固醇干扰试验结果。对于贴壁细胞，胰酶消化后，用含血清培养基重悬铺于新培养皿中以促进贴壁。待贴壁后，用 PBS 洗 2 次，换成含 1%BSA 的无血清的培养基。对于非贴壁细胞，重悬于含 1% BSA 的无血清的培养基中。37℃培养过夜。
4. 取 2×10^6 悬浮细胞或一个汇合生长至 70%～90%培养皿的贴壁细胞，用 PBS 或 BSS 洗 2 次，换入 1ml 的含 10mmol/L MBCD 的无血清培养基（可以含 1mg/ml BSA）。对照组换入不含 MBCD 的同样培养基。37℃孵育 10min、20min、30min 或 60min。
5. 移去并保留培养基（贴壁细胞）或细胞沉淀（非贴壁细胞），用 PBS 或 BSS 洗一遍。对贴壁不牢的贴壁细胞，将培养基转移至 1.5ml 小离心管中，最高转速离心 5min 以沉淀细胞并去除漂浮的细胞或大的细胞碎片。将上清吸到一个新的离心管中。
6. 在室温下用含 10% (V/V) Triton X-100 的 PBS 裂解单层贴壁细胞或离心后的悬浮细胞 20min。最高转速离心 1min，转移上清至一个新的离心管中。
7. 将留存的澄清培养基用 10% Triton X-100 的 PBS 溶液调至 1% Triton X-100 浓度。加 1/10 体积的 PBS 至澄清的细胞裂解物中。用液闪仪计数双份 100μl 澄清的细胞裂解物或培养基的放射活性。确定每次试验中培养基的总计数比例。

辅助方案 8 使用 MBCD-胆固醇复合物进行细胞胆固醇去除

胆固醇去除后对细胞产生的生理效应可以经由重新加入胆固醇（预先结合了胆固醇的 MBCD）来恢复。

材料（带√项目见附录 1）

胆固醇

1∶1 氯仿/甲醇

甲基-β-环糊精（MBCD；Sigma）

无血清的培养基

√PBS 或 BSS

带 Teflon 内衬螺旋盖子的 10～15ml 玻璃管

氮气蒸发器

浴槽式超声破碎仪

0.45μm 注射器式滤器

10ml 注射器

1. 以 1∶1（V/V）氯仿/甲醇制备 50mg/ml 胆固醇储存液。加 16μl 该溶液到一个带 Teflon 内衬螺旋盖子的 10～15ml 玻璃管内。氮气下蒸发溶剂。
2. 在 10ml 无血清培养基中溶解 MBCD 33.45mg。将它加入干燥的胆固醇中，振荡并在浴槽式超声仪中处理 1～3min 使之重悬。置 37℃孵育过夜。
3. 临用前，用 10ml 注射器将溶液通过 0.45μm 注射器式滤器以移去多余的胆固醇结晶。
4. 将 MBCD-胆固醇复合物加到已去除胆固醇的细胞中。对于贴壁细胞，加入正常培养体积的含复合物的培养基；对于悬浮细胞，用含复合物的培养基将细胞悬浮至 2×10^6 个细胞/ml。置 37℃孵育 2h。
5. 移去 MBCD-胆固醇复合物，用 PBS 或者 BSS 漂洗 2 次，而后重悬于生长培养基中，即可对细胞进行所需功能的测定。

参考文献：Yang and Reinherz，2001

撰 稿 人：Deborah A. Brown

［李楠（第三章）］

第四章　免疫荧光和细胞分离

抗体作为检测细胞表面抗原的灵敏和特异性的探针为细胞免疫学研究提供了有力的手段。检测的基本原则是：①抗体分子经化学处理后依然保持其结合抗原的活性；②标记物偶联到抗体后具有一定的稳定性；③偶联了标记物的抗体可采用简易的方法与未结合的标记物分离；④标记物需具有较高的灵敏度；⑤标记的抗体不仅能识别特定器官表达的抗原，而且能清楚地显示器官中哪种类型的细胞表达该抗原。

流式细胞仪检测需制备和标记细胞。在单元 4.1 介绍了多克隆抗体和单克隆抗体标记的基本流程。单元 4.2 介绍了 Becton Dickson 公司产品-Calibur 型号流式细胞仪的操作指南。

参考文献：Coons *et al*.，1941；Shapiro，1988

撰 稿 人：Ethan M. Shevach

单元 4.1　细胞制备和试剂

流式细胞仪用于分析细胞表达的膜表面抗原和胞内抗原，能够特异性地区分异质性群体中的不同细胞类型、评价分离细胞亚群的纯度、分析细胞大小和体积。该技术主要检测结合了某种细胞抗原分子的荧光偶联抗体或配体的荧光强度。

确定最佳的抗体浓度需要严格滴定标记过程中的所有试剂。最佳的胞内标记抗体浓度很可能与推荐的细胞表面标记抗体浓度不同。在间接标记时，一抗和二抗所用试剂也都需要预先滴定。在用预实验确定抗体的浓度时，应选取能最大区分样本荧光本底和自发荧光的抗体浓度。抗体的最佳浓度在应用于固定细胞时应较非固定的细胞自发荧光要高一些。研究抗原表达丰度时，确定抗体的饱和剂量至关重要，因为荧光强度代表了每个细胞上表达抗原的实际水平。进行胞内标记时，需要用没有经过固定和渗透的细胞以及不表达待测抗原的细胞作为实验的阴性对照，也需要以表达待测抗原的细胞作为阳性对照。

基本方案 1　单细胞表面抗原的免疫荧光标记

在进行单细胞表面抗原检测时，推荐设置以下对照。

单色对照　多色分析时，需要使用单色对照，将所采用的每种单色荧光标记抗体分别各自先标记一部分样品，用作同一个样品来源的多种荧光标记的对照。只要是涉及了多色标记，无论直接标记还是间接标记，都需要有单色标记的对照。单标对照还用于机器补偿的调节，因为有些荧光素的发射光谱有重叠。

试剂和细胞样品对照　为确定直接标记的本底，需要有阴性对照，即荧光素偶联的同型抗体标记的样品（即抗体非特异性结合细胞），用于确定任何标记试剂的非特异性

结合。阳性对照和阴性对照在确定标记试剂的特异性结合，以及同种特异性和异种特异性结合时非常重要。此外，在确定特异性结合时，可以设阴性对照预先使用过量的未偶联荧光的同一种抗体，封闭荧光染料偶联抗体的结合。

在间接标记时，无关一抗（通常是同型抗体）或者直接使用荧光偶联的二抗可用于确定荧光偶联二抗的本底荧光。

自发荧光对照　未标记的细胞可以用来确定细胞的自发荧光。

材料（带√项目见附录）

样品：淋巴组织（单元 2.1）或者人外周血单细胞悬液（单元 8.1）

√荧光标记用的缓冲液，4℃

荧光偶联和未偶联的抗体（见辅助方案 1 和 2），已经通过滴定稀释到合适的浓度

√50g/ml 碘化丙啶（可选用）

√固定液（可选用，使用前配制）

12mm×15mm 圆底试管或 96 孔圆底培养板

100μm 尼龙网

带有 H-1000B 的 SorvallTR-6000B 离心机（或者同等可替代的离心机）

1. 用眼科剪将淋巴组织的样品剪成小块，置小培养皿，预先加入 5ml 4℃的缓冲液，研磨至碎。
2. 将组织悬液移至试管，静置 2～3min，使粗组织块沉淀，然后将上清移至新的试管，或经过尼龙网过滤细胞悬液至试管。
3. 4℃，300g 离心 8min，弃上清。重悬细胞沉淀于 10ml 的 4℃缓冲液中。台盼蓝拒染法确定活细胞数（附录 3C）。
4. 4℃，300g 离心 8min，弃上清。重悬细胞于缓冲液，调整细胞终浓度至 2×10^7 个细胞/ml。取出 50μl 的细胞（1×10^6），置于 12mm×75mm 的圆底试管，或者 96 孔圆底培养板。
5. 在上述细胞中加入 10μl 合适浓度的荧光偶联抗体，混匀。冰浴 20min（低亲和力抗体需要延长时间或者提高孵育温度）。

6a. 使用试管进行标记：用 2ml 缓冲液洗涤 2 次，每次 4℃，300g 离心 6min，弃上清。

6b. 使用培养板标记：每次用 100μl 缓冲液洗涤，共 3～5 次。每次 4℃，500g 离心，弃上清。

对于间接标记，需要进行荧光标记的二抗、生物素/链亲和素或者是多色标记的抗体。每标记一种抗体都需要按照上述程序进行孵育、清洗。在多色分析时，如果确认抗体之间没有相互作用，可以同时进行孵育、洗涤。

7. 重悬细胞于 400μl、4℃的荧光标记用的缓冲液。上机前一直放置于 4℃。
8. 可选使用：加入 10μl 的 50μg/ml 的碘化丙啶，用于上机时排除死细胞。
9. 可选使用：细胞在分析前可进行固定。但固定后的细胞，尽量保持在 4℃，时间不超过 1 周。

基本方案 2　固定和渗透单细胞的细胞内抗原的免疫荧光标记

针对细胞内抗原的检测，应该尽量采用低分子质量的荧光染料，否则大分子的荧光

染料会降低抗体进入细胞内的运动性。异硫氰酸荧光磺（FITC）是一种小分子质量的荧光素，是最常用的商品化试剂，可以直接偶联到一抗或者间接试剂。尽管 FITC 带有负电荷，会导致非特异性结合增高，而且其发射光谱与细胞的自发荧光在相同的范围内，但是 FITC 还是广泛用于细胞内抗原的标记。其他没有 FITC 的缺点并且小分子质量的荧光染料有 AMCA、Cascade 蓝，然而这两种染料需要紫外激发，在通常的流式细胞仪中没有配备紫外激发的光源。PerCP 不能用于胞内标记，因为其在细胞内经渗透后荧光强度会减弱。

材料（带√项目见附录 1）

细胞样品：来源于人和鼠的外周血单个核细胞、骨髓细胞、胸腺和脾脏细胞；悬浮生长的细胞或者分散的组织细胞

√不含 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS，4℃

√固定液，4℃

√渗透液

√荧光标记用缓冲液

已经用标记缓冲液稀释到合适浓度的荧光标记的或生物素标记的，或未标记的抗体（见辅助方案 1 和 2 或使用商品化产品）

洗涤缓冲液（简称洗液）：PBS 含 0.1%Tween 20（V/V）（在棕色瓶中储存时间为 1 个月）

间接标记的荧光二抗或者生物素/链亲和素

PBS（附录 1）含有 1mg/ml PI 和 7-氨基放线菌素 D（7-AAD 可选用，见 PI 和 7-AAD 的配方）

1% 的多聚甲醛（m/V）

12mm×15mm 圆底试管

带有 H-1000B 的 SorvallTR-6000B（或者同等可替代的离心机）

62μm 尼龙网（可选用）

1. 取约 10^6 个细胞置于 12mm×15mm 圆底试管，加入无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 PBS，4℃，300g 离心 5min。

   如果有相当数量的死细胞存在，应该在固定和渗透前通过 Ficoll-Hypaque 分离去除；或者应用荧光染料标记死细胞，在流式细胞仪分析时排除这部分细胞。

2. 吸弃或者快速倾倒上清。加入 875μl 冷 PBS，混匀。加入 125μl 的冷固定液，混合。4℃孵育 1h。

3. 为了保证最佳的标记效率，根据所要标记的抗原适当调整固定液的浓度和孵育时间。4℃，300g 离心 5min。弃上清。加入 1ml 渗透液。混匀，37℃孵育 15min。加入 1ml PBS。4℃，300g 离心 5min。弃上清。

4. 对于未标记的、荧光标记的或者生物素标记的抗体：加入 100μl 工作浓度的抗体。混匀。4℃孵育 30min。加入 1ml 的洗液，4℃，300g 离心 5min。弃上清。再如此洗涤一遍。如果是采用直接标记法标记细胞，直接进行步骤 5a 和步骤 5b。对于采用间接标记法，用未标记的抗体或者生物素标记的抗体孵育后，再通过荧光标记的二抗

或者生物素/链亲和素重复进行以上的步骤。

在标记一抗前 1min，可以加入 50μl 的人 AB 血清或者正常小鼠血清进行封闭，以减少非特异性结合。如果分析细胞表面的免疫球蛋白，人 AB 血清不能用于封闭。对于某些抗体，需要提高孵育温度和延长孵育时间，如 IgM 类抗体，穿过细胞膜的效率低，比 IgG 抗体进入到细胞内慢。

5a. 如果不进行 DNA 含量测定：重悬细胞于缓冲液，浓度为 $1\times10^6\sim2\times10^6$ 个细胞/ml。有必要的话，用 62μm 尼龙网过滤样品去除团块。在上机前于 4℃避光保存。要获得最佳的结果，最好立即上机（2h 内）。如果要以后分析，重悬细胞于 1%的多聚甲醛中。

5b. 如果同时进行胞内抗原的标记和 DNA 含量测定，重悬 $1\times10^6\sim2\times10^6$ 个细胞/ml 于含有 20μg/ml 7-AAD，或者 10μg/ml PI 的 PBS 中。4℃孵育 30min。有必要的话，用 62μm 尼龙网过滤样品去除团块。在上机前于 4℃避光保存。2h 内上机。PI 可以和 FITC 同时使用；7-AAD 可以和 FITC 标记的抗体和 PE 标记的抗体同时使用。

辅助方案 1　用异硫氰酸荧光黄（FITC）偶联抗体

材料（带√项目见附录 1）

1～2mg/ml 的纯化单克隆抗体（单元 1.3）
√FITC 标记缓冲液，4℃
√透析液，4℃
5mg/ml FITC 溶解于无水 DMSO，使用前配制
Sephadex G-25（Pharmacia Biotech PD-10；可选用）

1. 用 500ml FITC 标记缓冲液在 4℃透析纯化的单抗，共 2d。期间更换 2 或 3 次缓冲液（通常情况下，5ml 的 1～2mg/ml 的抗体可以用 500ml 缓冲液）。在 A_{280} 处检测吸光度，确定抗体浓度（$=A_{280}\times0.74\times$稀释倍数）。
2. 每毫克抗体加入 20μl 的 5mg/ml FITC。室温孵育 2h。
3. 用透析液透析去除未结合的 FITC，共 2d。期间更换 2 或 3 次缓冲液。或者过 Sephadex G-25 去除。
4. 用透析液稀释 FITC-IgG 复合物，使 $A_{280}<2.0$。在 A_{280} 和 A_{492} 处检测吸光度，计算蛋白质浓度。

$$蛋白质(mg/ml)=\frac{A_{280}-(A_{492}\times0.35)}{1.4}$$

1.4 是 FITC 偶联抗体摩尔系数的倒数。

5. 计算蛋白质的摩尔数：

$$蛋白质(mol)=\frac{蛋白质(mg/ml)}{1.5\times10^5}$$

$$FITC(mol)=\frac{A_{492}}{0.69\times10^5}$$

$$1.5\times10^5=mol\cdot wt\cdot Ig$$

$$0.69\times10^5=mol\cdot wt\cdot FITC$$

6. 计算荧光素/蛋白质比（F/P）：

F/P=FITC 摩尔数/蛋白质摩尔数；F/P=5∶1～6∶1 最适于流式细胞仪使用。

辅助方案 2 长臂生物素偶联抗体

遵循 FITC 偶联方法（见辅助方案 1），替换以下试剂和步骤见特别说明。

附加材料（其他材料见辅助方案 1，带√项目见附录 1）

√琥珀酰亚胺乙酯标记缓冲液

10mg/ml 长臂生物素（long-armed Biotin，Zymed 公司）溶于 DMSO，临用前配制

1. 用与 FITC 偶联相同的方法透析 1～2mg/ml 的纯化抗体。在透析时，用琥珀酰亚胺乙酯标记缓冲液代替 FITC 标记缓冲液。在 A_{280} 处检测吸光度，确定抗体浓度（$=A_{280}\times0.74\times$稀释倍数）。
2. 每毫克抗体加入 10μl 的 10mg/ml 用无水 DMSO 配制的长臂生物素。室温孵育 1h。用与 FITC 相同的方法去除未结合的生物素（见辅助方案 1）。

备选方案 1 未固定细胞胞内抗原的免疫荧光检测

荧光素的选择和抗体的搭配见基本方案 2 的前言。

附加材料

含有 0.3%和 0.1%（*m/V*）的 Saponin-PBS：在棕色瓶中储存，4℃。

含有0.3%的 Saponin 和 10μg/ml PI 或 20μg/ml 的 7-AAD 的 PBS（推荐使用）：临用前加入 PI 或 7-AAD 储存液至合适浓度；避光保存。

1. 将约 2×10^6 个细胞置于 12mm×15mm 试管，补充 1～2ml PBS。4℃，300*g* 离心 5min。弃上清，再用 1～2ml PBS 洗一遍。4℃，300*g* 离心 5min。弃上清，轻弹试管底使细胞沉淀分散开。

   如果有相当数量的死细胞存在，在渗透前应该用 Ficoll-Hypaque 分离去除死细胞，或者用荧光染料标记死细胞，在流式分析时排除这部分细胞。
2. 用 0.3%的 Saponin-PBS 稀释荧光标记的抗体置合适的工作浓度。取 100μl 加入到细胞中。振荡混匀。4℃孵育 30min（孵育条件根据抗体特点可以适当改变）。
3. 加入 2ml PBS，4℃，300*g* 离心 5min。弃上清，细胞沉淀再用含有 0.1%Saponin-PBS 洗一遍。4℃，300*g* 离心 5min，弃上清。如果细胞采用荧光标记的一抗直接标记，根据需要直接进行步骤 5a 或 5b。
4. 如果采用的是间接标记，在步骤 2 和 3 标记一抗或者生物素偶联的一抗后，需要对荧光素标记的二抗或者荧光素标记的亲和素再进行二次标记，标记程序如步骤 2 和 3，只是将标记的抗体换成荧光素标记的二抗或荧光素标记的亲和素。

5a. 如果不同时进行 DNA 含量分析：重悬细胞于 PBS，浓度控制在 $1\times10^6\sim2\times10^6$ 个细胞/ml（不要使用 0.3%Saponin-PBS）；有必要的话，用尼龙网过滤细胞去除细胞团块。样品保存在 4℃，避光条件，直到上机。

5b. 如果同时进行 DNA 含量分析，重悬细胞于 0.3%的 Saponin 和 10μg/ml PI 或

20μg/ml 的 7-AAD 的 PBS，浓度控制在 $1\times10^6\sim2\times10^6$ 个细胞/ml，4℃孵育 10min。样品保存在 4℃，避光条件，直到上机。有必要的话，用尼龙网过滤细胞去除细胞团块。

备选方案 2 用 7-氨基放线菌素 D（7-AAD）标记死细胞

附加材料（其他材料见基本方案 2，带√项目见附录 1）

√1mg/ml 的 7-AAD 储存液

√含有 80μg/ml 放线菌素 D（AD）的固定液，4℃保存（AD，储存液见附录 1）

含有 10μg/ml AD 的 0.2%和 0.1%（*V*/*V*）Tween 20-PBS（附录 1）（储存液见配方）

含有 10μg/ml AD 的标记缓冲液（AD 储存液见配方）

荧光标记抗体配制在 0.3%（*m*/*V*）Saponin-PBS（附录 1）含有 10μg/ml 的 AD（附录 1）

0.3%（*m*/*V*）Saponin-PBS（附录 1）含有 10μg/ml 的 AD（PBS 和 AD 储存液见附录 1）

1. 将 $1\times10^6\sim2\times10^6$ 个细胞置于 12mm×15mm 试管，补充 1～2ml PBS。4℃，离心 5min，300*g*。弃上清，1ml 标记缓冲液重悬细胞。加入 1μl 的 1mg/ml 的 7-AAD 储存液至终浓度 1μg/ml。混匀细胞，避光孵育 20min。
2. 4℃，300*g* 离心 5min。弃上清。重悬细胞于 3ml PBS，4℃，300*g* 离心 5min。

标记固定细胞和渗透的单细胞悬液

3a. 弃上清。加入 875μl 的冷 PBS 于细胞沉淀。温和混匀。加入 125μl 的冷的含有 80μg/ml 的放线菌素 D（AD）的固定液。温和混匀。4℃孵育 1h。

4a. 按照基本方案 2 的步骤 3 和 4，用 Tween 20 处理细胞，进行细胞内抗原的免疫荧光标记。但固定和渗透细胞用 0.2%和 0.1%的 Tween 20-PBS，标记缓冲液中含有 10μg/ml的 AD。

未固定细胞用 Saponin 渗透

3b. 快速去除上清。加入 100μl 合适浓度荧光标记抗体的 0.3%（*m*/*V*）Saponin 10μg/ml AD-PBS。温和混匀。4℃孵育 30min。

4b. 加入 2ml 的含有 10μg/ml AD 的标记缓冲液。4℃，300*g* 离心 5min。弃上清。用 1ml 的 0.1%（*m*/*V*）Saponin/PBS/AD 再洗一遍。4℃，300*g* 离心 5min。细胞内抗原的荧光标记见辅助方案 1 的步骤 2～5，Saponin 和标记缓冲液中添加 AD 至终浓度 10μg/ml。

参考文献：Schmid *et al.*，1991

撰 稿 人：Kevin Holmes，Larry M. Lantz，B. J. Fowlkes，Ingrid Schmid，and Janis V. Giorgi

单元 4.2　流式细胞仪分析技术-BD 公司出品的流式细胞仪

FACScalibur/CELLQuest 系统介绍

BD 公司出品的 FACScalibur 型号流式细胞仪和 CELLQuest 是双组件流式细胞仪，包括以下内容。①湿体单位：由激光发射光源，鞘液，发射光检测器组成；②带有 CELLQuest 软件的计算机，用于获取和分析数据。对于每个分析的细胞，这个系统允许进行任何一个单参数的度量（光散射或者荧光强度）和其他最多 4 个参数的度量的相关性分析，因此可以分析所有细胞或者带有明确特征的细胞。这五个可以测量的参数是：FSC、SSC、FL1、FL2、FL3。如果有第二根激光管，FACS Calibur 还能够测量另外一个荧光参数 FL4。在激光照射光束和细胞流交接的横切面，激光可以在细胞各个方向上散射，但是只有在前向角和直角（90°）侧向的散射可被检测器检测。前向角反映细胞的大小，侧向角反映细胞的粒度（细胞内部的复杂度）。FSC 和 SSC 检测器不检测荧光信号，用于区分细胞（包括未标记的和荧光标记的）和颗粒性碎片，也用于衡量细胞大小和粒度。另外 4 个检测器，即 FL1、FL2、FL3、FL4，通过在光电倍增光管前设置不同的光学滤光片检测荧光发射的不同波带。表 4.2.1 列出了 FACS Calibur 常用的荧光染料和该染料发射光的检测器。最常用的荧光染料组合包括：FITC（绿色荧光；FL1 检测器）、PE（橘红色荧光；FL2 检测器）和 PE-CY5 或者 PerCP（红色荧光；FL3 检测器）。如果仪器还安装了红色二极管激光，APC（红色，FL4 检测器）也可以和上述染料组合。电脑系统允许探测器对不同荧光的发射光谱重叠的部分进行补偿调节，减少不同荧光之间的“串色”。

表 4.2.1　FACS Calibur 使用的荧光染料

荧光素[a,b]	发射峰/nm	检测器	滤片
FITC	525（绿色）	FL1	530/30
PE	575（橘红）	FL2	585/42
PI	620（红色）	FL2，FL3	
PerCP	675（红色）	FL3	670LP
PE-CY7[b]	767（红色）	FL3	
PE-CY5[b]	670（红色）	FL3	
APC	660	FL4	661/16
CY-5	670	FL4	

a. 不能用 FACS Calibur 检测的荧光染料有罗丹明及其衍生物，因为它们不能被 488 氩离子激光器激发。得克萨斯红可被 488 激光器激发，但其发射光强度很弱。上表所列的是 FACS Calibur 推荐使用的红色染料。

b. PE-CY5 在不同供应商中的其他名称：CyChrome（Parmingen）；Tricolor（Caltag）；Quantum Red（Sigma）；Red670（Life Technologies）。

安装在 Macintosh 平台上的 CELLQuest 软件用于数据的获取和分析。启动后，CELLQuest 打开一个未标题文件，作为实验的记录文件。实验的记录文件可以保存在桌面，以后再使用时可以打开方便参数设置。此外，经过调节的仪器状态的设置参数也可以保存，在常规检测样品时，可以通过打开保存的设置方便参数调整。

基本方案　FITC 偶联抗体的单色分析

参阅 Cellquest 软件使用指南。

材料

等渗盐水，储存在 FACS Calibur 鞘液箱（遵循 BD 公司的推荐，选用合适鞘液）

对照和待检细胞样品：$1\times10^6\sim2\times10^6$ 个/ml 未标记细胞；FITC 标记的阳性细胞；FITC 标记的待检样品细胞，以上细胞重悬于标记缓冲液中，冰浴（≥250μl/份）。

标记缓冲液：PBS 含有 2%（*V*/*V*）热灭活的 FBS 或者 1%（*m*/*V*）BSA/0.1%（*m*/*V*）叠氮钠

去离子水配制的 10%（*V*/*V*）漂白液（含次氯酸钠）

流式细胞仪系统组成：

- FACS Calibur（Becton Dickinson）
- FACS 工作站（获取界面）适于 Macintosh 系统
- Macintosh Quadra650（或者更高的 Quadra 系列）计算机带有 16MB 的 RAM 和 1MB 的 VRAM
- Macintosh 系统软件第 7 版或更高级别
- Macintosh 兼容打印机

CELLQuest 软件

1. 进行常规 FACS Calibur 鞘液维持和检查，包括用等张盐水装满鞘液箱，倒空废液。打开电源，从管道中排掉空气，将液体控制阀扳到 Standby 状态，打开计算机和打印机。FACSComp 软件和 Calibrite 微球进行仪器检查和灵敏度测试（见辅助方案 1）。

   备选，用于检测的荧光微球可以从不同的生产商得到。通过对荧光微球数据的获取和分析进行每天例行的仪器设置和调整，在每次检查时可以采用相同的倍增电压。表 4.2.2 列出了应用 4.5μm 黄绿微球采用的推荐电压。

2. 退出 FACS Comp，启动 CELLQuest。将实验记录窗口最大化，点击右上的“放大”按钮。

3. 从 Plots 菜单上选择“Dot Plot”命令打开 Plot 窗口。并在 Plot 窗口上点击 pop-up 按钮，选择获取（Acquisition）。在 X 参数上选择 FSC，Y 参数上选择 SSC，点击 OK。重复这个过程，在 Y 参数上选择 FL1-H。点击所要移动的图并拖拽该图的框架至合适位置。

4. 从 Plots 菜单上选择 Histogram Plot（直方图）命令。并在 Plot 窗口上点击 pop-up 按钮，选择获取（Acquisition）。选择 FSC 参数，点击 OK。点击并拖拽直方图的框架至合适位置。

5. 从获取菜单上选择联机到流式细胞仪。从“Cytometer”菜单上选择检测器/增幅（Detectors/Amps）命令，设置倍增幅度。选择域值（Threshold）命令，设置 FSC 参数的域值。

   倍增增幅和 FSC 阈值可以参照表 4.2.2 的数值再进行微调，或者通过恢复

FACSComp 中的 Calib 设置文件（见辅助方案 1）。从 Cytometer 菜单选择 Instrument Setting，打开 Calib 文件，点击 Instrument Setting 窗口的 Set，来恢复 Calib 设置文件。FSC 阈值用于区分细胞、碎片以及电噪声。倍增增幅和 PMT 电压的调整可以在 FACS Calibur 前板控制或者 Detector/Amps 窗口进行。

表 4.2.2 FACS Calibur 两色或三色分析的常用参数设置[a,b]

参数	荧光微球[c]	FITC/PE/PI[d]	FITC/PE/Red[d,e]
FSC	E(-1)/log	E(00)/1.53	E(00)/1.53
SSC	Log/250	2.90/310V	2.90/310V
FL1(log)	250	626	600
FL2(log)	250	497	500
FL3(log)	250	397	590
FL1-FL2	0	0.7	0.5
FL2-FL1	0	24.7	36.5
FL2-FL3	0	0	1.9
FL3-FL2	0	8.9	10.0
Threshold	FL1/52	FSC/52	FSC/52

a. 此处给出的设置参数值仅仅作为参考，不一定在任何时候都适用；此外一台 FACS Calibur 的设置参数也不一定适用于其他 FACS Calibur 机器。

b. 缩略写：FSC，前向角；SSC，侧向角；FL1，荧光 1(530nm)；FL2，荧光 2(585nm)；FL3，荧光 3(650nm)；E(−1)，−1 次幂的设置；

c. 4.5μm 直径的 YG 荧光微球。其他微球需要不同的设置。

d. 此处推荐的设置条件适用于新鲜分离的淋巴细胞；如果是培养细胞和肿瘤细胞，FSC 电压需要更高的值，此外这些细胞的自发荧光更高，需要将 PMT 电压和增幅减少。

e. 此处推荐的设置参数条件是针对 TRI-COLOR(Caltag 公司)或者 CyChrome(Pharmingen 公司)。其他红色荧光染料，如 RED613(Life Technologies)和 PerCP(Becton Dickinson 公司)需要不同的设置参数(表 4.2.1)。

6. 将含有去离子水的流式管从吸样针取下，按 Run（运行）按钮。振荡混匀未标记的对照管，将 FACS Calibur 的吸样针置于其中。确认状态运行正常后，点击 Acquisition Control 窗口的“Acquisition”。
7. 增加或减少 FSC 的增幅使细胞的绝大多数位于 FSC 轴中点附近。同样增加或减少 SSC 的增幅使细胞的绝大多数位于 SSC 轴中点附近。
8. 从工具调色板上选取多角形区域工具，圈出区域 1，使其包含活细胞，将死细胞、碎片和红细胞排除在外。依次点击点图和直方图命令，在“gate”的下拉菜单中，用区域 1 作为“gate”（G1＝R1），作出 FSC-FL1 点图和 FL1 的直方图。

   “Region”工具可用于选定 FSC-SSC 图中你所感兴趣的特定群体。在获取过程中收集到的偶然出现的小气泡也会表现出光散射的特点，因此在 FSC-SSC 图中特别地圈出区域 1 将其排除。不要将区域 1 圈得过于局限，以至于丢失了你所感兴趣的细胞。进一步对数据的设门过程可以在数据获取之后再做，可以做得更为严格一些，以排除细胞碎片和死细胞。
9. 调节 FL1 的 PMT 电压，使未标记的细胞在 FL1 的直方图中的位置位于 1～10 荧光强度单位。设置 FL1 的值≥1U；注意，值≤1U 被自动设定为 1，10 000U 的值设定为 10 000U。

10. 从获取和储存菜单中激活获取和储存窗口。在获取下拉菜单中不要改变默认设置(即选择接受和全部)。

    该操作会处理在 FSC 阈值之上的全部颗粒。如果选择了特定的门(如 R1 或 R2)的数据，那么只有圈在该门中的颗粒可以在直方图中显示，或者储存在数据文件中。

11. 在 Collection Criteria box 中，确定想要收集的细胞数(全部颗粒数或者特定门中的颗粒数)。在储存窗口中，确定是否所有的颗粒还是特定门中的颗粒的数目用于储存。最后，在分辨率盒中，选择是 1024 的分辨率还是 256 的分辨率。
12. 从获取菜单上选择 Parameter Description 命令激活"Parameter Description"窗口。点击"文件夹"按钮，用目标文件夹菜单，在硬盘上建立文件夹保存数据。点击位于目标文件夹窗口底部的选择按钮。
13. 点击"Parameter Description"窗口中的"File"按钮，激活"File Name Editor"窗口。在文件名编辑窗口的"Custom Prefix field"，为将要检测的样品数据键入名称。点击 OK 接受选项。如果在"File Name Suffix"下拉菜单接受默认的数据计数设定，CELLQuest 会在数据名的尾部附加 001，以后的每一个样品数据在保存时按顺序依次为 002、003 等。
14. 将 FACS Calibur 的吸样针置于第一个实验细胞样品中。在获取窗口，在 Setup 盒前小方框中将√点掉，点击获取。当计数完成后，取出样品。更换新样品重复这项操作，如此进行所有的实验样品。如果细胞密度低，在样品之间上去离子水或者 PBS 10～20s，消除前一个样品留有的少量细胞的干扰。
15. 当样品全部上完和数据均已保存后，将吸样针置于 2～3ml 的 10%漂白剂中，高速进样 5min。然后更换 2～3ml 的去离子水，再高速进样 5min。转换流体控制阀至 Standby 状态。关掉 FACS Calibur，吸样针浸入在 1ml 的去离子水中。选择退出。保存实验记录文件以备将来使用。如果不想将来使用该实验记录文件，选择不保存，退出程序。

    详见本章最后的表 4.2.3。

辅助方案 1 用校准微球和 FACSComp 软件进行仪器检测

FACSComp 的全部内容在 FACS Calibur FACSComp 软件使用指南中。FACSComp 程序有 3 项功能：自动调整光电倍增管的电压，自动调整 FL1 和 FL2 的电补偿和确定 FSC、SSC、FL1 和 FL2 参数的仪器灵敏度。

附加材料(其他材料见基本方案)

CaliBRITE 标准荧光微球(Becton Dickson)

FACSComp 软件程序(Becton Dickson)

1. 按照 FACSComp 软件使用指南准备未标记微球管和混合微球管(未标记微球+FITC-微球+PE-微球)。
2. 运行 Macintosh 系统的 FACSComp。在"Sign Up"栏键入相应的信息，点击"Accept"。在"Set Up"栏，键入未标记、FITC 标记、PE 标记的 CaliBRITE 微球的

批次数，点击“Accept”。

3. 进样未标记微球，按运行键。选择位于 FACSComp 窗口底端的开始按钮，启动光电倍增管的自动调整。当光电倍增管的设置成功的信息显示后，表明这次的检测完成，取出未标记微球样品，更换上 3 种微球的混合管。从主菜单上选择 Comp，或者从菜单底端选择下一个，进行自动荧光补偿的调整。

   当调整完成后，将显示补偿设置成功的信息。

4. 在横跨屏幕顶端的主菜单上选择 Sens 按钮，或者底端窗口菜单上选择下一个。在 FACSComp 运行时，打开和关闭 FACS Calibur 检测脉冲。

   如果在优先选择菜单中选择显示灵敏度结果这项操作，灵敏度结果在退出 FACSComp 时会显示，并且打印出来。打印的结果可以用来与以后的结果进行对比。在灵敏度测试和调整后，仪器设置文件只包含最近的一次结果。这个文件命名为 Calib，保存在 BD 优先选择文件夹，位于系统文件夹的优先选择文件夹中。

辅助方案 2　单色分析区分活细胞和死细胞

附加材料（其他材料见基本方案）

100μg/ml 的 PI-PBS：4℃避光保存

1. 设置 FACS Calibur 到最佳状态（见基本方案，步骤 1～8)。在基本方案的步骤 8 操作完成后，在获取的设置模式下，上未标记对照细胞样品。调节 FL1 和 FL2 的光电倍增电压使绝大多数细胞位于 FL1-FL2 点图的左下角。依次建立ⓐFSC vs SSC 点图；ⓑ FL1 vs FL2 点图；ⓒFL1 直方图；ⓓ FL2 直方图。

2. 从流式细胞仪菜单中选择补偿。上 FITC 阳性对照细胞。增加 FL2-%FL1 补偿，使 FL1 阳性细胞在 FL2 上的信号强度与未标记细胞的一样（一般情况下，FL2-%FL1 在 5%～30%)。

3. 加 5～10μl 的 100μg/ml 的 PI 于未标记细胞/ml，然后上样（应该可检测出少量的 FL2 阳性细胞)。

   不是所有的 PI 阳性的死细胞都可以通过区域 1 排除（区域 1 定义的是 FSC vs SSC 点图的活细胞)。为了在一个点图中观察到所有的 PI 阳性细胞，需要从 Plot 菜单选择 Format Dot Plot，然后确信该点图没有经过设门。也就是，在 Gate 下拉菜单中选择 No gate。然后改变门的选择回到区域 1。

4. 从工具调色板上，选择多角形区域工具，在 FL2 直方图或者 FL1-FL2 点图中勾出区域 2，使其包含 PI 阴性的活细胞。选择“gate”菜单，明确门 3（G3）等于 R1 和 R2 共有的颗粒（R1＋R2)。

   即进入门 3 的每一个细胞必须位于区域 1（FSC vs SSC）和区域 2（排除 PI 阳性的 FL2 阴性细胞)。

5. 从获取菜单上，选择获取和储存，明确收集标准是储存门 3（即 G3＝R1＋R2)。

   只有落入到门 3（活细胞，PI 阴性）的细胞被计数，并计入到磁盘储存文件；然而当前依然显示所有的颗粒（包括门中的颗粒和门外的颗粒)，除非将“gate”盒改为门 3 或在获取和储存窗口的获取门下拉菜单中接受门 3。

6. 获取和储存每个样品的数据（见基本方案，步骤 10～15）。为了在统计上有显著性，每个样品应获取≥10 000 的颗粒。

PI 对一些细胞具有毒性，可以被活细胞缓慢摄取；因此，除非已经明确某种细胞能够长时间地不摄取 PI，常规情况下，应在上样前加 PI。

备选方案 1　FITC 和 PE 偶联抗体的双色分析

附加材料（其他材料见基本方案）

对照和实验细胞：1×10^6～2×10^6 个细胞/ml 的未标记细胞、FITC 和 PE 标记的阳性对照细胞、FITC 和（或）PE 标记的样品细胞，以上细胞悬浮于标记缓冲液，放置于冰上（体积≥250μl/管；见基本方案）

1. 根据表 4.2.2 的指南调节检测器的增幅和电压。启动 CELLQuest 软件，优化参数（见基本方案，步骤 1～8）。建立 FL1-FL2 点图（见基本方案，步骤 3）
2. 上未标记细胞。调节 FL1 和 FL2 的 PMT 电压，使未标记细胞在图的左下角。
3. 上 FITC 标记的阳性细胞，调节 FL-2% FL1 补偿，使 FL1 阳性和 FL1 阴性细胞在 FL2 轴上具有相同的本底水平 FL2 强度，即 FL1 阳性细胞的 FL2 中位数与 FL1 阴性细胞的 FL2 的中位数一致。
4. 上 PE 标记的阳性细胞。调节 FL1-FL2%补偿，使 FL2 阳性和 FL2 阴性细胞在 FL1 轴上具有相同的本底水平 FL1 强度，FL2 阳性细胞的 FL1 中位数与 FL2 阴性细胞的 FL1 的中位数一致。
5. 上未标记细胞、FITC 标记的阳性对照细胞和 PE 标记的阳性对照细胞的混合物。需要的话，进行精细的补偿调节。在最终的补偿调节后不要改动 FL1 和 FL2 的 PMT 电压，任何在电压上的改动都需要重新进行补偿调节。不要补偿过度。
6. 运行和获取对照和实验样品，进行单色分析（见基本方案，步骤 10～15）。为了获得统计学意义，获取≥30 000 的颗粒事件。在参数保存盒中确认 FL1-H 和 FL2-H（获取和储存窗口）。

辅助方案 3　双色分析区分活细胞和死细胞

附加材料（其他材料见基本方案和备选方案 1）

100μg/ml 的 PI-PBS：4℃避光保存

1. 调节 FL1 和 FL2 的电压和补偿（见备选方案 1，步骤 1～4）。建立 FL2-FL3 的点图。设置 FL3 的电压使未标记细胞位于图的左下角。
2. 上未标记细胞，然后上 PE 阳性对照细胞。调节 FL3-FL2%补偿，使 PE 阳性和 PE 阴性细胞在 FL3 轴上具有相同的本底水平 FL3 强度，PE 阳性细胞的 FL3 中位数与 PE 阴性细胞的 FL3 的中位数一致。
3. 加入 5～10μl 的 100μg/ml 的 PI-PBS 于未标记对照细胞。在 FL2-FL3 点图中，在 PI 阴性细胞（活细胞）处勾出矩形区域 2。

在门窗口，确定 G3（门 3）等于 R1 和 R2 包含的活细胞（R1 为 FSC-SSC 中圈

定的细胞群；R2 为 FL3/PI 阴性的细胞)。在获取菜单中，选择获取和储存窗口，设置收集标准＋储存门为 G3（G3＝R1＋R2)。

4. 进行每个样品的获取和数据储存（见基本方案，步骤 10～15)。获取 30 000～100 000颗粒事件。确保在参数保存盒中选定 FL1-H 和 FL2-H（“Acquisition and Storage”窗口)。如果在参数保存盒中没有选定 FL3-H，也仍可以用来区分活细胞和死细胞。

   PI 对一些细胞具有毒性，可以被活细胞缓慢摄取；因此，常规情况下，应在上样前加 PI。

备选方案 2　三色分析

附加材料（其他材料见基本方案和备选方案 1)

红色标记的阳性对照细胞（表 4.2.1 列出的可商品化获得的红色荧光染料)

1～3 种荧光染料偶联的抗体标记的实验样品细胞（FITC、PE、red)

1. 在 FSC-SSC 点图中，用区域 1 区分开活细胞和死细胞。进行双色分析，调节 FL1 和 FL2 的电压和补偿分析 FITC 和 PE 标记的细胞（见备选方案 1，步骤 1～4)。设置 FL2-FL3 点图。设置 FL3 的 PMT 电压使未标记细胞位于点图的左下角。
2. 上未标记细胞，然后上 PE 标记的细胞。调节 FL3-FL2％的补偿时未标记细胞和 PE 标记细胞有同样本底水平的 FL3 荧光强度。
3. 上未标记细胞，然后上红色荧光标记的细胞。调节 FL2-FL3％补偿使未标记细胞和红色标记细胞在 FL2 荧光上有相同的本底水平。
4. 上未标记、FLTC 标记、PE 标记和红色荧光标记细胞的混合物。在实时点图上观察每对荧光之间的补偿是否合适（FITC/PE、PE/red)，需要的话，进行微调至最佳。
5. 实验样品的上样和数据获取的操作见单色分析（见基本方案，步骤 10～15)。为了获得统计学意义，获取≥50 000 的颗粒事件。

备选方案 3　四色分析

附加材料（其他材料见基本方案和备选方案 2)

APC 标记的微球（Becton Dickinson)

APC（或 APC-CY5）标记的阳性细胞和 PE-Cy5（或者 PerCP）标记的阳性对照细胞

1～4 种荧光染料偶联抗体标记的实验细胞样品［即 FITC、PE、PE-Cy5 和（或）APC］

添加红色双激光管和 FL4 检测器的 FACS Calibur

1. 运行 CELLQuest，联机，打开记录模板命名为“时间延迟校准”（Time Delay Calibration)，包含两个带有统计特征和进行时间延迟校准指南的直方图。通过在位于检测器/Amps 窗口底端的 FL4 选择方形盒中点，打开红色激光。选择对数格式的 FL4 荧光强度，确认所有的补偿设置为零。确认或者选定 FSC 作为域值参数，设置为 200。

2. 上 APC 标记的微球并选择运行。调节 FSC 的倍增到 FSC 直方图中的平均值在 400±5。调节 FL4 的 PMT 直到 FL4 的荧光强度平均值所在的通道位于 APC 微球包装盒（BD 公司）内所列的通道。按下高速上样压力按钮，从流式细胞仪菜单上选择时间延迟校准。电机校准，等待校准程序完成；完成后仪器会发出声音表明操作完成。
3. 运行时间延迟校准。通过勾画区域 1 区分死细胞和活细胞（FSC-SSC 点图，见基本方案，步骤 3）。通过勾画的区域 1 作为门（见基本方案，步骤 8）。
4. 进行 3 色分析，调节 FL1、FL2、FL3 电压和补偿分析 FITC、PE、red 标记细胞（见备选方案 2，步骤 1）。
5. 建立 FL3-FL4 点图。选择 FL4PMT 电压，使标记细胞位于图的左下角。
6. 运行红色标记对照细胞。调节 FL4-%FL3 补偿使未标记和红色荧光标记的细胞有相同本底水平的 FL4。
7. 运行 APC 标记的对照细胞。调节 FL3-%FL4 补偿使未标记和 APC 标记的细胞有相同水平的 FL3。
8. 运行未标记的，FITC、PE、red 和 APC 标记的对照细胞的混合物。在实时点图上观察每对荧光之间的补偿是否合适（FITC/PE、PE/red 和 red/APC）。需要的话，进行微调至最佳。
9. 运行和获取对照和实验细胞样品。操作同单色分析（见基本方案，步骤 10～15）。

表 4.2.3　FACS Calibur 问题指南

问题	可能原因	解决办法
获取状态下没有颗粒出现		
如果状态窗口显示状态："ready"（准备好）	域值参数设置过高或过低	增加或减少倍增幅
	域值没有选择正确的参数（通常为 FSC）	选择正确的参数（通常为 FSC）
	吸样针堵塞	移开吸样针底架，用漂白液作为样品上样冲洗管道
	BAL 密封破损	更换新的 BAL 密封
	计算机和 FACS Calibur 联机失败	关掉计算机和仪器。打开仪器，然后打开电脑
	GPIO 错误，不能读取仪器状态	关掉计算机和仪器。重新修复 GPIO 缆线，位于细胞仪后面电源线附近。打开计算机
如果状态窗口显示"STANDBY"（待机）	未打开 "RUN"	按 "RUN" 按钮
	样品管破损	更换新的样品管
	鞘液箱未密封	拧紧鞘液箱
	通气阀开关推向另一方向（即鞘液箱处于通气状态）	通气阀扳回，施加压力给鞘液箱
	BAL 密封破损	更换新的 BAL 密封

续表

问题	可能原因	解决办法
如果状态窗口显示“NOT READY”（未准备好）	激光器处于加热过程	等待 5min
	激光没有功能	检测激光电源状态窗口。如果电压显示为 0，关掉细胞仪和电脑，然后依次打开细胞仪和电脑。如果电压仍为 0，联系 BD 公司
	鞘液系统渗漏	用试管检查状态窗口，推开样品进样，仪器处于运行模式。样品电压应该在 10.2V 左右。如果低于 10.0V，更换鞘液箱，更换帽子，密封垫圈
	鞘液箱空虚或者废液箱漫溢	检查鞘液箱，装满鞘液；倒空废液箱
高样品颗粒速度	在细胞流中有气泡	按压 PRIME 键，排空气泡
	鞘液系统中有空气	从鞘液过滤器排气
	域值过低	增加域值
	样品浓度过高	稀释样品。最佳样品浓度为 $1\times10^5\sim1\times10^7$ 个细胞/ml
低样品速度	域值设定过高	减少域值
	样品未充分混匀	混匀样品
	样品稀释过大	浓缩样品
	进样针堵塞	用 10%漂白液或者 Contrad 作为样品进样 20min，然后用去离子水再行进样 10min
散射参数扭曲	流动的细胞内出现气泡	按 Press 键排气，使液体充满管道
	鞘液过滤系统有气泡	排气
	流式细胞仪脏	例行每月的清洁程序
时间延迟校准	鞘液系统气泡	清洗过滤器的气泡
超出范围错误	鞘液过滤系统阻塞	更换过滤器
	鞘液脏	用 Contrad 去垢液清洗
	垫圈松	拧紧垫圈
	鞘液箱裂缝	更换鞘液箱
	激光流漂移	告知专业人员进行调整

参考文献：FACS Calibur User's Guide，CELLQuest Software User's Guide，FACS Calibur FACSComp User's Guide

撰 稿 人：Kevin L. Holmes，Gillis Otten，and Wayne M. Yokoyama

［刘书逊（第四章）］

第五章　细胞因子及其受体

本章描述了参与调控免疫应答的主要细胞因子及其受体的一系列测定方法。本章的第一部分提供了各种白细胞介素和 γ 干扰素的检测方法。单元 5.1 介绍了使用鼠 IL-2 和 IL-4 的中和抗体，在一种细胞因子存在的情况下来检测并定量其中一种细胞因子的方法。由于小鼠细胞不能针对人 IL-4 产生应答，使用细胞株对建立人 IL-2 的特异性测定方法非常有用。可供选择的方法还有采用人 IL-4 受体 cDNA 转染的 CT. 4S 细胞测定人 IL-4，如 CT. h4S 细胞。这些细胞对 10pg/ml 的人 IL-4 有应答，也对高浓度（>100U/ml）的人 IL-2 有应答。

ELISA 方法检测细胞因子有诸多优点，包括高度特异性、操作简便、避免组织培养及放射性操作。但是，ELISA 同样也有不少的缺点，和其他生物学方法相比，显著的缺点是灵敏度较低、需要合适的抗体或抗血清、检测的是蛋白质的免疫学活性而不是生物学活性。现有大量的商业公司提供测定各种细胞因子的 ELISA 试剂盒，但是，这些商业化检测试剂盒的适用性和灵敏度还需要经过更长时间的考验，而且高价格也影响了其在许多实验室中的应用。IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18 的标准 ELISA 测定方法概括于单元 5.2～5.6 中。单元 5.6 所述的 ELISA 方法检测成熟（有活性）形式的人 IL-18，也可测定不成熟（无活性）和成熟形式的鼠 IL-18。高特异性测定 γ 干扰素的 ELISA 方法见单元 5.7。单元 5.12 描述了测定所有干扰素（α、β、γ）的标准病毒中和方法。

本章中描述了检测细胞因子分泌细胞的三种方法。单元 5.11 描述了用酶联免疫斑点（ELISPOT）方法检测细胞因子分泌细胞。通常，如果有两种高亲和力的细胞因子特异性抗体直接和同一细胞因子的不同表位作用，可以用标准 ELISA 方法测定，也可以用 ELISPOT 方法测定细胞因子分泌细胞。作为和 ELISA 相同的实验方法，ELISPOT 技术可以检测分泌细胞因子的单个细胞。用流式细胞仪不但能测定细胞因子分泌细胞也能检测胞内细胞因子。单元 5.8 介绍了几种用流式细胞仪分析胞内细胞因子的方法。多种细胞因子可以同时检测用来区别 Th1 和 Th2 细胞，另外，细胞表面染色也可以进行多参数分析。同时这部分内容也包括了通过活化 T 细胞来增加胞内细胞因子水平及确定细胞因子特异性的方法。最后，单元 5.10 介绍了用流式细胞仪对细胞因子分泌细胞进行计数的方法，在这个方法中捕获试剂（双特异性抗体）与细胞表面标志分子结合而固定在细胞表面，捕获试剂的另一端可以结合细胞分泌的细胞因子。捕获在细胞表面的细胞因子可以通过使用标记的抗细胞因子的抗体来测定，也可以用免疫磁珠分离表达细胞因子的细胞来测定。

趋化因子主要作用于白细胞，并能选择性诱导某类细胞的迁移（如嗜中性粒细胞、单核细胞、淋巴细胞成纤维细胞）。单元 5.13 介绍的生物学方法可以测定对趋化因子应答的细胞的趋化运动和胞内自由钙离子的趋向性和增加量。

单元 5.9 介绍了采用标记的细胞因子或细胞因子受体特异性单抗来检测膜表达细胞因

子受体的流式细胞仪方法。同时，也介绍了采用多参数方法检测细胞亚群的受体表达。另外，抗体的荧光标记和流式细胞分析的方法和步骤在单元 4.1 和 4.2 中已经详细描述。

本章中所涉及的检测方法均需要采用标准细胞因子进行标定。表 5.0.1 列出了一些已经商业化的人和小鼠的细胞因子。此外，下列项目、机构提供人细胞因子的参考试剂：国家癌症研究所（Behtesda，Md.）的生物反应调节剂计划；国家过敏性和传染性疾病研究所（Behtesda，Md.）的微生物和传染性病系；国家生物标准和控制研究所（伦敦，英国）。这些试剂以小包装提供（约 1μg/样品），仅用于体外实验和实验室。目前，这些试剂包括 IFN-α、IFN-β、IFN-γ、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-3、IL-4、IL-6、G-CSF、GM-CSF、M-CSF、TGF-β、TNF-α。通过以下联系方式可获得这些试剂：Dr. Craig Reynolds，Biological Resourses Branch，Building 1052，Room253，Biological Response Modifiers Program，National Cancer Insitute/Frederick Cancer Research and Development Center，Frederick，MD 21702-1201。

表 5.0.1 商业化的重组人和小鼠细胞因子[a]

细胞因子[b]	人[c]	小鼠[c]
IL-1α	CR，GB，GN，RD，UBI	GN
IL-1β	AB，BI，CR，GN，RD，UBI	BI，GN，PG
IL-2	AB，BI ，CR，GN ，GB，RD，UBI	BI，CR，GN
IL-3	AB，BI，GN，RD，UBI	CR，GN，GB
IL-4	AB，GN，RD，UBI	BI，GN，PG
IL-5	AB，BI，RD，UBI	GN，PG
IL-6	AB，BI，CR，GN，GB，RD，UBI	BI，GB，UBI
IL-7	AB，BI，GB，UBI	BI，GB，UBI
IL-8（NAP-1）	AB，BI，GB，GN	
IL-9	RD	RD
IL-10	PG，BI，PE	BA，PG，BI
IFN-α	AB，CR，BI	BI
IFN-β	GB，BI	BI
IFN-γ	AB，CR，GB，GN，UBI	AB，BI，GN，GB
GM-CSF	AB，CR，GB，GN，UBI	BI，CR，GB，GN，UBI
G-CSF	AB，BA	
M-CSF	GN	
SCF	GN，PE，RD	GN，RD
TGF-β	AB，GB，GN	
TNF-α	AB，BI，GB，GN，RD，UBI	GN，GB
TNF-β	GB，GN，RD	

a. 此表并没有列出所有的商业来源。

b. 缩写：G-CSF，粒细胞集落刺激因子；GM-CSF，粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子；IFN，干扰素；IL，白细胞介素；M-CSF，巨噬细胞集落刺激因子；TGF，转化生长因子；TNF，肿瘤坏死因子。

c. 供应商：AB，Amgen Biologicals；BA，Bachem；BI，Biosource International；CR，Collaborative Research；GB，GIBCO/BRL；GN，Genzyme；PE，Pepro Tech；PG，Pharmingen；RD，R&D System；UBI，Upstate Biotechnology。各公司地址和电话见附录 4。

除了使用重组的细胞因子外，许多细胞因子的生物活性可以用具有中和活性的特异性抗细胞因子 MAb 测定。表 5.0.2 列出了商业化的许多抗细胞因子的 MAb；其他可

从ATCC获得，列在其他单元中。市场上销售的多克隆抗细胞因子抗体，在生物学测定中还是存在问题的，因为组织培养中使用的血清存在复杂成分。培养上清被证明有生物活性后，使用抗细胞因子中和抗体可确定上清中的细胞因子确实能介导生物活性。

表 5.0.2　商业化的中和抗细胞因子的单克隆抗体[a]

细胞因子[b]	人[c]	小鼠[c]
IL-1α	CR，OS	
IL-1β	BI，CR	EN
IL-2	BI，GN	GN，PG
IL-3	GN	GN，PG
IL-4	BI	GN，PG
IL-5		PG
IL-6	BI，BM，CR，GN	BI，GN，PG
IL-7	GN，BI，PE	BI，GN
IL-8（NAP-1）		
IL-10		PG，GN
IFN-α	BI，BM	
IFN-β	BM	
IFN-γ	BM，GN，BI	AB，GN，PG
GM-CSF	EN，GN，OS	AB，EN，GB
G-CSF	OS	
M-CSF	OS	
SCF		GN
TGF-β	GN，BI	
TNF-α	BM，EN，BI	GN，PG，EN
TNF-β	BM	GN

a. 此表并没有列出所有商业化的中和抗细胞因子的单克隆抗体。

b. 缩写：G-CSF，粒细胞集落刺激因子；GM-CSF，粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子；IFN，干扰素；IL，白细胞介素；M-CSF，巨噬细胞集落刺激因子；TGF，转化生长因子；TNF，肿瘤坏死因子。

c. 供应商：AB，Amgen Biologicals；BI，Biosource International；BM，Boehringer Mannhein；CR，Collaborative Research；GB，GIBCO/BRL；GN，Genzyme；OS，Oncogene Science；PG，Pharmingen；RD，R&D System；UBI，Upstate Biotechnology。各个公司的地址和电话见附录4。

单元 5.1　IL-2 和 IL-4 的检测

注意： 所有用于细胞培养的试剂和仪器均需为无菌。

基本方案　采用 CTLL-2 细胞检测小鼠 IL-2 和 IL-4

通过刺激CTLL-2细胞检测培养上清中的小鼠IL-2和IL-4，比较总的T细胞生长

因子（TCGF）活性和抗体封闭后的活性。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠上清样品
重组小鼠 IL-2（Amgen）和 IL-4（Genzyme）
√RPMI-10 完全培养基
CTLL-2 T 细胞（ATCC）
淋巴细胞分离液（LSM；Organon Teknika Cappel）
^{3}H TdR
IL-2 封闭抗体（大鼠抗小鼠 IL-2，S4B6；ATCC）
IL-4 封闭抗体（大鼠抗小鼠 IL-4，11B11；ATCC）
平底 96 孔板（Costar）
Srovall RT6000B 离心机及 50ml 离心管

1. 在 96 孔板中，加入 50μl 经 RPMI-10 完全培养基稀释的样品上清及重组小鼠 IL-2 和 IL-4 标准品（一般进行 5 倍稀释，从 10%～0.016%）。每个样品做 3 个复孔。

   再次检测应使用同一批标准品来控制标准品每天的变化。

2. 收集指数生长期的 CTLL-2 细胞（见辅助方案 2），放入 50ml 离心管中，加入 RPMI-10 完全培养基至总体积为 50ml。室温，335*g* 离心 8min。倒去上清，用少量体积的培养基重悬细胞（约 1ml），再补加 RPMI-10 培养基至总体积 50ml。重复洗涤 2 次。
3. 用台盼蓝拒染法测定细胞活性（附录 3C）。如果细胞活力小于 90%，用 LSM 离心细胞来富集活细胞（单元 2.1）。
4. 用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞，并调整细胞密度为 1×10^{5} 个细胞/ml。
5. 在 96 孔板的每孔加入 50μl 细胞悬液。用塑料盖盖住孔板以防止蒸发。放入 37℃，5% CO_2 培养箱中培养 24h。
6. 加入 ^{3}H TdR 继续培养 24h（详细标记见附录 3E）。收获细胞，并用 β 液闪仪测定 ^{3}H TdR 掺入值。
7. 计算总 TCGF 量（见辅助方案 1）。取半数最大刺激时的 TCGF 浓度为 1U/ml。更精确计算 50%活性的方法是将所得数据概率转换为直线图（Gillis *et al.*，1978）。
8. 按照步骤 1 所述准备 4 块新的定量孔板（起始及终浓度相同）。
9. 按照步骤 2～4 所述用 RPMI-10 完全培养基洗涤并重悬 CTLL-2 细胞。将细胞分成 4 份放入 4 个离心管。
10. 在 CTLL-2 细胞中加入封闭抗体。一个离心管中加入抗 IL-2，一个加入抗 IL-4，一个同时加入这两种抗体，另一管不加任何抗体。

    含有抗 IL-2 抗体的管测定 IL-4 特异性，反之亦然。含有两种抗体的管测定不确定的淋巴因子诱导 CTLL-2 的增殖，这样可以检测所有的 IL-2 和 IL-4 引起的生物学活性，排除其他的诱导因素。

    根据抗体活性确定所要加入抗体的浓度（封闭抗体浓度不变），通过 100～1000 倍改变相关纯化的或重组淋巴因子的浓度来控制滴度曲线（图 5.1.1）。

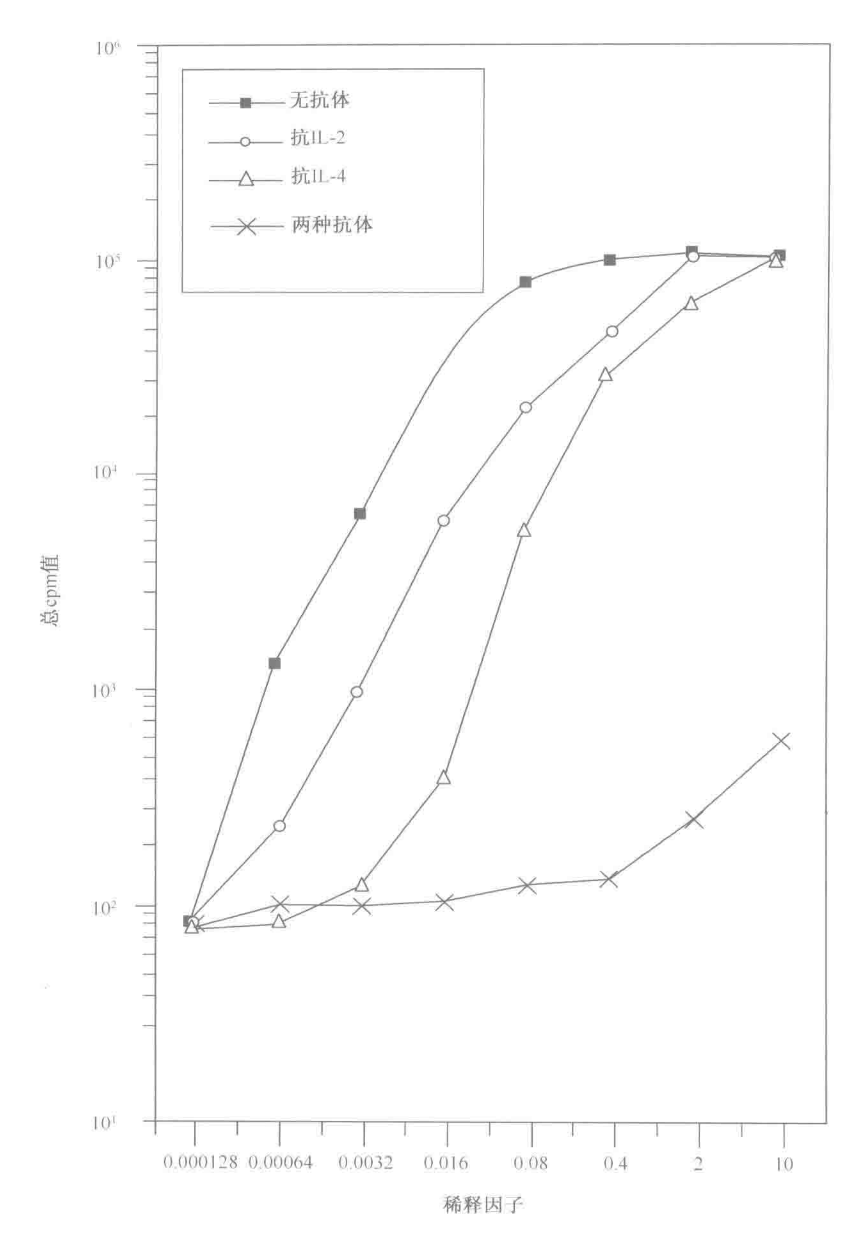


图 5.1.1　在有/无抗 IL-4（11B11）和抗 IL-2（S4B6）的情况下 CTLL 细胞对含有 IL-4 和 IL-2 的上清的增殖反应。上清以 5 倍增量的稀释度稀释（从 1∶10 稀释度开始），分别加入至 5×10^3 个 CTLL 细胞（见基本方案）。48h 后检测 ^{3}H TdR 掺入值，以总 cpm 值表示。

11. 在 96 孔板的每个孔中加入步骤 8 中准备好的 50μl CTLL-2 细胞悬液（一块板应对应一个离心管中的细胞），重复步骤 5～7。
12. 通过比较总 TCGF 单位数和封闭抗体存在下的 TCGF 单位数来分别计算单独的 IL-2 和 IL-4 所诱导的 TCGF。例如，确定 IL-2 存在时 TCGF 的单位数比例是通过比

较总 TCGF 和抗 IL-4 存在时的 TCGF 单位数获得。通过比较抗 IL-4 抗体存在下的 TCGF 活性和两种抗体都存在下的 TCGF 活性的不同来计算 IL-2 活性。

IL-2 活性单位也可用已建立的小鼠 IL-2 标准计算得到。

备选方案 1　采用 CTLL-2 细胞检测人 IL-2

因为 CTLL-2 细胞对人 IL-2 有特异性应答，而不对其他生长因子产生应答，因此不需要用单克隆抗体来检测其特异性。从人细胞中获得的样品中通常所含的 IL-2 水平较低。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

人血清或上清样品

重组人 IL-2（Amgen）

√PBS，HBSS，或其他盐溶液

1. 用 RMPI-10 完全培养基稀释 IL-2 标准品和样品。在 96 孔板中加入 100μl 标准品及样品，3 个复孔。培养基作为阴性对照，也作为样品中所存在的任何刺激因素（有丝分裂原、抗原、佛波醇酯）的对照。

   滴定 IL-2 标准品取能够使细胞达到最大 DNA 合成的最低稀释度（通常 20～40U/ml IL-2）。典型标准曲线的范围为 20U/ml 到低于 0.3U/ml。使用一致的标准品稀释度减少各次 CTLL-2 反应间的变化。

   培养上清稀释率用 1∶1、1∶2、1∶4。如果最大刺激在 1∶4 时，则进行进一步稀释。人血清样品可能需要进一步稀释，因为通常人血清含有 IL-2 抑制剂，会影响测定结果。为了控制抑制剂的活性，用含有人血清和不含有人血清的 RPMI-10 稀释重组 IL-2 标准品。

2. 在最后一次换液后 2d 收集 CTLL-2 细胞。用 PBS 洗涤细胞 3 次：细胞转到 50ml 离心管中，加入 50ml PBS。4℃，335g 离心 10min。弃上清，用小量体积（约 1ml）的 PBS 轻轻地重悬细胞沉淀，然后补足到 50ml 体积。离心，重复 2 次。用 2～5ml RPMI-10 完全培养基重悬细胞沉淀。
3. 计数并用 RPMI-10 完全培养基调整细胞密度为 5×10^4 个细胞/ml。在 96 孔板每个孔中加入 100μl 细胞悬液。
4. 放入 37℃，5% CO_2 培养箱中培养 28h。如果培养箱中的湿度不够的话，孔板用塑料盖盖住以防止液体蒸发。
5. 在最后 8h 加入 ^{3}H TdR（附录 3E）。收获细胞并用 β 液闪仪测定 ^{3}H TdR 掺入值（附录 3E）。

   如果细胞经过相同时间的刺激并经过相同时间后收获，则这种检测方法具有较高的重复性。

备选方案 2　采用 CT.4S 细胞检测小鼠 IL-4

一般 CTLL-2 细胞对 IL-2 有较好的应答，但是对 IL-4 的应答则时有变化。CTLL-2 的变异亚系 CT.4S 细胞对 IL-4 有较强的应答，对 IL-2 的应答次之，对其他已知的细

胞因子则不应答（Hu-Li *et al.*，1989）；因此，使用 CT. 4S 可以高灵敏度地特异性检测 IL-4。CT. 4S 能用来从含有 100U/ml 的 IL-2 或其他细胞因子的样品中特异性地定量小鼠 IL-4。无需使用单克隆抗体来中和 IL-4，但在确定由 IL-4 引起的活性时则需要用到。CT. 4S 细胞对人 IL-4 不应答。CT. 4S 细胞从 Dr. W. E. Paul 获得（Laboratory of Immunology，National Insitute of Allergy and Infectious Diseases，Bethesda，MD 20892）。CT. 4S 细胞的培养见辅助方案 3。

备选方案 3 采用 CT. h4S 细胞检测人 IL-4

CT. 4S 衍生系 CT. h4S 细胞稳定转染人 IL-4 受体 cDNA 用于检测人 IL-4。这种细胞对低于 10pg/ml 的人 IL-4 仍有应答。在本方法中，利用中和抗 IL-4 抗体来确定增殖应答是由 IL-4 引起时要慎重。CT. h4S 细胞的培养见辅助方案 4。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

重组人 IL-4（R&D Systems）

CT. h4S 细胞（Dr. W. E. Paul，Laboratory of Immunology，National Insitute of Allergy and Infectious Diseases，Bethesda，MD 20892）

√PBS

细胞刮

1. 稀释 IL-4 标准品和样品（见基本方案，步骤 1）。
2. 在最后一次换液后 2d 收集 CT. h4S 细胞，用细胞刮从培养瓶上刮下细胞。放入 50ml 离心管，计数（附录 3C）。加入 50ml PBS 洗涤 1 次，4℃，220*g* 离心 10min。用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞并调整细胞密度为 5×10^4 个细胞/ml，置于冰上。

   离心细胞时不要超过 265*g*，在没有 IL-4 时不要超过 30min。
3. 加 100μl 细胞悬液到含有 IL-4 标准品、样品及培养基（阴性对照）的各个孔中。放入 37℃，5% CO_2 培养箱中培养 48h。
4. 加入 ^{3}H TdR 并继续培养 18h。收获细胞并用 β 液闪仪测定 ^{3}H TdR 掺入值（附录 3E）。

辅助方案 1 白细胞介素或 T 细胞生长因子（TCGF）单位的计算

用 CTLL-2 检测到的数据可以很好地通过概率分析进行处理，概率分析参照由国际癌症研究所的生物应答调节计划（BRMP）提供的标准 IL-2 制备物或者内部标准 IL-2 制备物进行分析。在下面的例子中，使用 BRMP 标准作为对照。

1. 将样品 ^{3}H TdR 掺入值 cpm 转换成最大 cpm 的百分数。
2. 将转换好的数据画成概率图（稀释率对最大计数百分数；图 5. 1. 2）或直接转换成对数值。
3. 将 x 轴转化成对照生长因子样品稀释率的 $\log_2$ 形式。未稀释样品为 0，x 轴上的稀释率依次标记为 1～5。
4. y 轴表示 50%生长因子（F_{50}）活性单位，为样品的 F_{50}/对照的 F_{50}。BRMP 对照在

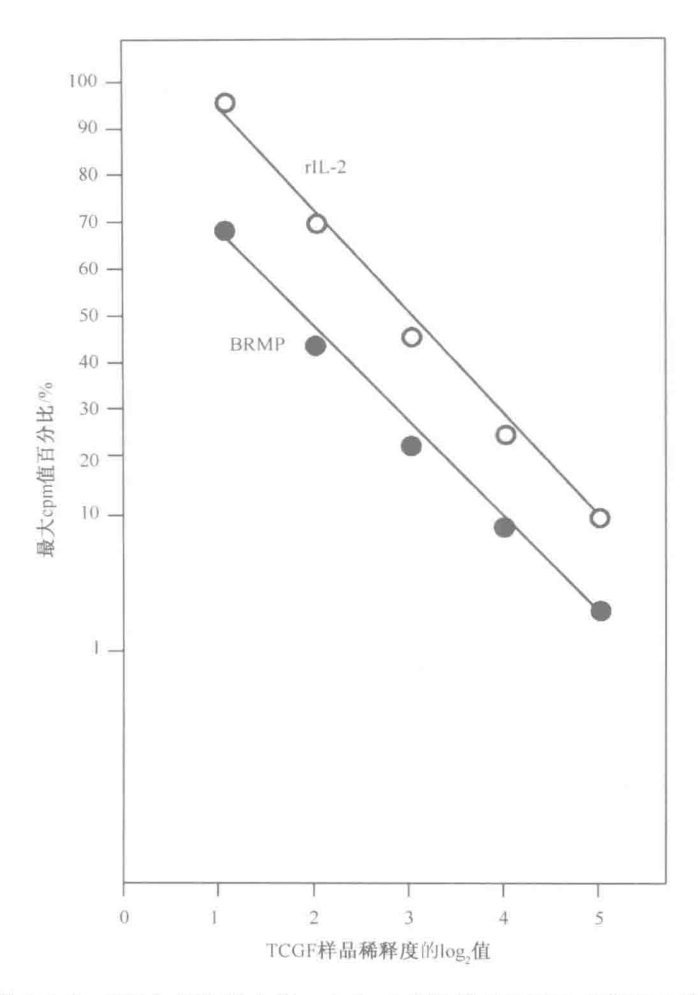


图 5.1.2　CTLL 细胞对人 IL-2 和 IL-2 参照试剂 BRMP 的增殖应答。

y 轴上的 50%活性时在 $x=1.9$ 处取得。因此，BRMP 对照稀释率的 $\log_2$ 为 $2^{1.9}$ 或 3.73，3.73/3.73=1U 活性。rIL-2 的 F_{50} 的 x 值为 3，同样的表示成指数形式为 2^3 或 8。因此，rIL-2 样品含有 8/3.73 或 2.14U 活性。

图 5.1.2 中比较了 BRMP 标准品和 rIL-2 样品（Cetus）。从图上可以得到 BRMP 标准品和 rIL-2 样品最大 DNA 合成的一半分别为 7.9U/ml 和 4U/ml。最大 DNA 合成一半时得到的不同数值，强调了在比较用多种检测方法检测样品时同一来源的对照 IL-2 的重要性，也可能是每个试验室之间的差异导致的。

辅助方案 2　小鼠 CTLL-2 细胞的维持

附加材料（其他材料见基本方案）

重组人 IL-2（Amgen）

75cm² 组织培养瓶（Corning）

1. 用添加 1U/ml 重组人 IL-2 的 RPMI-10 完全培养基维持连续增殖的 CTLL-2 细胞。

其他来源的 IL-2 也可以维持 CTLL-2 生长，但 CTLL-2 细胞的增殖除了因为 IL-2以外还可能依赖于其他来源的生长因子，这在生物检测中会产生较高的背景应答。

2. 以 $0.5\times10^5 \sim 1\times10^6$ 个细胞/ml 的接种密度将 CTLL-2 细胞用 25ml RPMI-10 完全培养基加到 $75cm^2$ 培养瓶中培养。
3. 收获细胞时用力吹打培养瓶使贴壁 CTLL-2 细胞脱落。
4. 当密度达到 1×10^6 个细胞/ml 时以 1∶5 或 1∶10 传代（通常每周传代 2 次）。
5. 传代后至少 2d 再使用细胞。

传代后 CTLL-2 细胞的 IL-2 受体会立即饱和，若在此时使用细胞会导致高背景且降低灵敏度。

辅助方案 3　小鼠 CT. 4S 细胞的维持

附加材料（其他材料见基本方案）

$75cm^2$ 组织培养瓶（Corning）

1. 用添加 100U/ml 重组鼠 IL-4 的 RPMI-10 完全培养基维持连续增殖的 CT. 4S 细胞。

其他来源的 IL-4，如用 Con A 刺激的 D10. G4. 1 T_H2 T 细胞克隆（ATCC）的上清，也可以维持 CT. 4S 细胞的生长，并且更加经济。

2. 以 $0.5\times10^5 \sim 1\times10^6$ 个细胞/ml 的接种密度将 CT. 4S 细胞用 15ml RPMI-10 完全培养基加到 $75cm^2$ 培养瓶中培养。
3. 收获细胞时用力吹打培养瓶使贴壁 CT. 4S 细胞脱落。

CT. 4S 细胞为贴壁细胞，在指数期收集细胞密度可达 1×10^6 个细胞/ml。

4. 当密度达到 1×10^6 个细胞/ml 时以 1∶5 或 1∶10 传代（通常每周传代 2 次）。所有洗涤及重悬细胞的操作要快速进行，因为细胞会重新贴壁。
5. 传代后至少 2d 再使用细胞。

和 CTLL-2 细胞一样，传代后 CT. 4S 细胞的 IL-2 受体会饱和。

辅助方案 4　小鼠 CT. h4S 细胞的维持

CT. h4S 细胞的维持在 CT. 4S 细胞培养液的基础上，添加终浓度为 1mmol/L 丙酮酸钠（GIBCO/BRL）和 10ng/ml 重组人 IL-4（R&D System）。丙酮酸钠用于维持转染细胞的活性。细胞通常每周传代 2 次，每隔 4 天若没有新鲜的 IL-4 细胞将不能存活。含有 IL-4 的新鲜培养基应每周配制一次。这种细胞的长期培养不应添加人 IL-2，因为细胞会转而对培养上清中的 IL-2 依赖，而丧失对人 IL-4 的依赖性。冻存细胞时需要加重组 IL-4。

参考文献：Hu-Li *et al.*，1989；Mosmann *et al.*，1986

撰 稿 人：Laurie S. Davis，Peter E. Lipsky，and Kim Bottomly

单元 5.2 IL-10 的检测

基本方案

本方案在 ELISA 方法中采用小鼠 IL-10 特异性的抗体检测小鼠 IL-10，不能检测人或病毒的 IL-10。使用针对其他种属的抗 IL-10 的抗体按照相同的操作流程可以检测其他种属的 IL-10。本方法具有高度特异性，对测定样品中存在的其他细胞因子不敏感。

材料（带√项目见附录 1）

包被抗体：纯化的抗 IL-10 MAb（JES-5-2A5 鼠 IgG1 抗鼠 IL-10；Pharmingen）
√PBS
已知浓度的纯化的小鼠 IL-10 标准品
√RPMI-10 完全培养基
待测样品
封闭液：10%（V/V）FCS，PBS 配制，无菌过滤，4℃保存
洗涤缓冲液：0.05%（V/V）Tween 20，PBS 配制，室温保存 1～2 周
生物素化的二抗（SXC1 抗鼠 IL-10；Pharmingen）
√二抗缓冲液
辣根过氧化物酶（HRP）偶联的链亲和素（Jackson Immunoresearch ＃016-030-084）
√底物溶液
终止液：0.2mol/L 柠檬酸钠，室温保存
12 通道移液器
检测板：96 孔圆底聚乙烯微孔滴定板（Dynatech，Falcon）
96 孔聚苯乙烯微量板
ELISA 板洗涤仪（如 Elcatech 的 Elcawash）
多孔扫描分光光度计（可测双波长；如 VMAX、Molecular Devices）
曲线分析软件（如 Molecular Devices 的 Softmax 或 Biometallics 的 DeltaSoft）

1. 准备 1～10μg/ml 包被抗体，PBS 配制。用 12 通道移液器立即在检测板的每孔中加入 50μl 包被抗体，37℃孵育 30min。

   根据经验确定所有包被抗体的量。不能有其他蛋白存在，因为它们会和抗体竞争性结合到塑料位点上。

2. 在 96 孔聚苯乙烯板中，按如下方法系列稀释 IL-10 标准品。加 100μl RPMI-10 完全培养基到 B～G 行的第 2、3 列。在孔 G2、G3 中加入 100μl 10ng/ml IL-10 标准品，混匀，从中吸取 100μl 加到孔 F2、F3 中。重复一系列的倍比稀释直到 C 行，最后稀释到孔 C2、C3 中取 100μl 丢弃。B2、B3（只加培养基）作为阴性对照。

   对于小鼠 T 细胞克隆上清，标准曲线的稀释率应以 1/10～1/100 开始。

3. B～G 行的 4～11 列加入 100μl 待测样品。如果样品的浓度可以预先估计的话，先将样品稀释到标准曲线范围内。否则，加入未稀释的样品及稀释 10 倍及 100 倍的样品。
4. 在每个孔中（包被抗体无需去除）加入 200μl 封闭液封闭板上多余的蛋白质结合位点。37℃孵育 10min。
5. 按如下方法用 ELISA 板洗涤仪及洗涤缓冲液洗涤检测板。将板子放到洗涤仪上，并打开缓冲液入口。当缓冲液流入孔中后，轻轻旋转板子确保洗涤彻底。3～4s 后，关闭缓冲液入口，板子旋转 180°，重复洗涤步骤。板子正面朝下在吸水纸上用力拍干。注意不要使孔的底部变形。
6. 从稀释好的板中取 50μl 标准品和样品对应地加到检测板的各孔中。使用多道移液器加样，每行更换枪头防止交叉污染。
7. 盖上检测板的盖子于 37℃孵育 30min。倒掉样品，并按照步骤 5 用洗涤仪洗涤检测板。
8. 预先用二抗缓冲液将生物素化的 SXC1 二抗调整至最佳浓度（通常为 0.01～0.1μg/ml）。检测板每孔中加入 50μl，盖上盖子，37℃孵育 30min。

   每批抗体的最佳稀释率都要确定。
9. 倒掉上清并按步骤 5 洗板。
10. 用二抗缓冲液稀释 HRP 偶联的链亲和素，并选择最佳浓度（通常 1/5000～1/10 000）。每孔加入 50μl，37℃孵育 30min。

    每批结合物的最佳稀释率都要确定。
11. 倒掉上清并按步骤 5 洗板。至少更换 3 次洗板方向保证彻底洗涤。
12. 检测板每孔加入 100μl 新鲜配制的底物溶液。盖上盖子，室温孵育直到颜色发生变化（一般 60min）。若颜色较弱，可避光过夜孵育。
13. 每孔加 100μl 终止液，用多孔扫描分光光度计测定每孔的最佳密度值，测定波长为 405nm，参考波长为 490nm。
14. 计算标准曲线，用曲线分析软件根据标准曲线计算出未知样品的值。

    Softmax 和 Deltasoft 软件可计算标准曲线，零值，待测样品值，以及用于直接计算原始样品的 IL-10 浓度的稀释率。结果显示每次试验之间会有一些变化，能提供较好匹配的曲线类型可以是线性的或四种参数匹配的。使用能提供最佳近似于标准曲线的曲线，不要用落在标准曲线外的点来计算待测样品。

参考文献：Fiorentino *et al.*，1989；Mosmann *et al.*，1990

撰 稿 人：Tim Mosmann

单元 5.3　IL-12 的检测

注意：所有和细胞接触的试剂和设备均须无菌，并使用无菌操作。

注意：所有抗体储存液和参考标准品分装后于－20℃保存。

基本方案　人和小鼠 IL-12 p75 异二聚体的 ELISA 检测方法

此为特异性检测 IL-12 异二聚体的方法。因为不能检测 IL-12 p40 单体，因此本方法能够在过量 IL-12 p40 亚基存在的情况下检测 IL-12 p75 异二聚体。

材料（带√项目见附录 1）

ELISA 包被抗体：大鼠抗人 IL-12 异二聚体单克隆抗体 20C2（由 R. Chizzonite，Hoffmann-LaRoche 提供）或大鼠抗小鼠 IL-12 异二聚体单克隆抗体 9A5（由 R. Presky，Hoffmann-LaRoche 提供）
√包被缓冲液
√洗涤缓冲液
√封闭液
IL-12 参考标准品：人或小鼠 IL-12（由 M. Gately，Hoffmann-LaRoche 提供）
√检测缓冲液
含有 IL-12 的待测样品
大鼠抗人 IL-12 p40 亚基单克隆抗体 4D6（由 R. Chizzonite，Hoffmann-LaRoche 提供）或大鼠抗小鼠 IL-12 p40 亚基单克隆抗体 5C3（由 D. Presky，Hoffmann-LaRoche 提供），均偶联辣根过氧化物酶（HRP）
HRP 的显色底物（如 K 蓝底物、ELISA Technologies），根据生产商的说明配制
适合的底物终止液（如针对 K 蓝底物的 1mol/L H_3PO_4）
多通道移液器
检测板：96 孔带盖的 EIA 板（如 Immulon II、Dynatech）
适合 HRP 底物的 ELISA 读板仪

1. 解冻 ELISA 包被抗体，并用包被缓冲液稀释到 2.5μg/ml（抗人 IL-12）或 5μg/ml（抗小鼠 IL-12）。
2. 立即用多道移液器在检测板的每个孔中加入 100μl 稀释好的包被抗体。盖上盖子于 4℃过夜孵育。
3. 吸去或倒去板中液体再加入洗涤缓冲液，用洗涤缓冲液洗涤检测板 3 次。
4. 每孔加 200μl 封闭抗体于 37℃孵育 1h 或 4℃过夜孵育。若需要，将包被好的检测板在 4℃保存于封闭液中（至少稳定 2 周）。
5. 用检测缓冲液稀释 IL-12 参考标准品至 1ng/ml。在 1.5ml 的离心管中准备好 6 个梯度的 2 倍比稀释（最终为 15.6pg/ml）。
6. 在 1.5ml 离心管中，用检测缓冲液准备好未知样品的 2 倍比的梯度稀释，起始稀释率使 IL-12 的浓度在 1～0.1ng/ml 范围内。

   若不能估计未知样品的浓度，进行 4 个梯度的 5 倍比的稀释，培养上清或血清样品都以 1∶1 为起始稀释率。
7. 吸去或倒去抗体包被好的检测板孔中的溶液，按照步骤 3 洗板 3 次。
8. 加 100μl IL-12 标准品和未知样品的每个稀释液到包被好的检测板中，每个样品做 3 个复孔。加 100μl 检测缓冲液至少到 2 个孔中作为背景控制。室温振荡孵育 2h 或 4℃过夜。

9. 吸去或倒去孔中液体，按照步骤 3 洗板 5 次。
10. 用检测缓冲液稀释 HRP 偶联抗体 4D6 至 250ng/ml 或 HRP 结合抗体 5C3 至 500ng/ml。每孔加 100μl 稀释抗体，室温孵育 2h。
11. 按照步骤 3 洗板 5 次，然后每孔中加入 100μl 发色底物。室温孵育 10～15min。
12. 每孔中加入 100μl 终止液，用 ELISA 读板仪根据 HRP 底物对应的波长读板。
13. 绘制标准曲线（吸光度比 pg/ml IL-12），并根据标准曲线计算未知样品中 IL-12 的浓度（见单元 5.2 中细胞因子 ELISA 计算结果）。

备选方案　人和小鼠 IL-12 p40 亚基的 ELISA 检测

IL-2 异二聚体产物常常伴随着 IL-12 p40 亚基产物的产生（通常≥5 倍）。基本方案里采用能识别 IL-12 p40 异二聚体和游离形式的亚基的包被抗体用来检测这两种形式的产物。针对人 IL-12，用小鼠抗人 IL-12 p40 亚基单克隆抗体 2-3A1（由 R. Chizzonite，Hoffmann-LaRoche 提供），浓度稀释到 2.5μg/ml。针对小鼠 IL-12，用抗小鼠 IL-12 p40 亚基抗体 5D9（由 D. Presky，Hoffmann-LaRoche 提供），浓度稀释到 5μg/ml。

结合基本方案，这个方法除了可评价 IL-12 p40 同源二聚体外还可被用来评价游离的 p40 亚基。这种方法不太适合测定 IL-12 异二聚体，因为 IL-12 的 p40 亚基在体外和体内通常以 p35 亚基形式大量的产生。因此，在一些样品中尽管 IL-12 异二聚体的含量低于检测限度，但少量的 IL-12 p40 仍可能被检测到。

参考文献：Trinchieri，1994

撰 稿 人：Maurice K. Gately，Richard Chizzonite，and David H. Presky

单元 5.4　IL-13 的检测

基本方案

ELISA 对人或小鼠 IL-13 高度特异性，不识别样品中的其他细胞因子。

材料（带√项目见附录 1）

包被抗体：纯化的抗人 IL-13 单克隆抗体（JES10-35G12 鼠 IgG_{2a}；从 ATCC 获得，得到 DNAX 许可），抗人单克隆抗体 MAB213（R&D Systems），或抗小鼠单克隆抗体 MAB413（R&D Systems）

√PBS

封闭溶液：20%（V/V）FBS（56℃热灭活 1h），PBS 配制（无菌过滤，4℃保存）

10ng/ml IL-13 标准品（PepeoTech）

√RPMI-10 完全培养基

待测样品

洗涤缓冲液：0.05%（V/V）Tween 20，PBS 配制（室温保存不超过 2 周）

生物素结合的二抗（JES10-2E10 抗人 IL-13；从 ATCC 获得，得到 DNAX 许可；

单元 4.1)，生物酰化的抗人多克隆抗体 BAF213 (R&D Systems)，或生物酰化的抗小鼠多克隆抗体 BAF413 (R&D Systems)

二抗稀释缓冲液：1% (m/V) BSA/0.05% (V/V) PBS 配制的 Tween 20 (V/V)

辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的链亲和素 (Jackson Immunoresearch)

√底物溶液

检测板：96 孔圆底聚乙烯微量板 (Dynatech)

96 孔聚苯乙烯微量板

微量板洗涤仪 (如 Elcatech 的 Elcawash) 或塑料洗瓶

微量板读板仪 (酶联仪)

1. 用 PBS 稀释包被抗体至浓度为 5μg/ml。立即加入至检测板，每孔加 50μl，盖上盖子，37℃孵育 2h，或 4℃过夜。

   不应有其他蛋白存在，防止其与抗体竞争性结合板上的结合位点。

2. 每孔加入 150μl 封闭液以封闭包被好的检测板上多余的蛋白结合位点 (包被抗体无需去除)。37℃孵育 20min。
3. 在封闭检测板的同时，在 96 孔板中用 RPMI-10 完全培养基对 10ng/ml IL-13 标准品进行 2 倍比梯度稀释。设置好板中所要加 50μl 体积稀释物的位置 (如一行的 11 个孔)，最后一个孔加培养基作为空白对照。每个稀释度做 2 个复孔。用盖子或塑料包被物完全盖住检测板。
4. 用 RPMI-10 完全培养基 2 倍比系列稀释待测样品，50μl 体积，2 个复孔。
5. 采用微量板洗涤仪或洗瓶用洗涤缓冲液彻底洗涤检测板。一个方向上漂洗 2～3s，然后旋转 180°重复洗涤。用力甩出残留液体，在吸水纸上拍干。
6. 将稀释好的标准品和待测样品转移到检测板中。盖上盖子，室温孵育 2h。用力甩出样品，按照步骤 5 洗板。
7. 用二抗稀释缓冲液稀释生物素偶联抗体至 1μg/ml。每孔加 50μl，盖上盖子，室温孵育 45min。用力甩出液体，按步骤 5 洗板。
8. 按照生产商说明书用二抗稀释缓冲液稀释 HRP 偶联的链亲和素至最佳浓度。每孔加 50μl，盖上盖子，室温孵育 45min。用力甩出结合液，按步骤 5 洗板。
9. 每孔加入 100μl 新鲜配制的底物溶液，室温孵育 50～60min 直到出现绿色。
10. 以 405nm 为测定波长，490nm 为参照波长用酶联仪读取最佳密度值。
11. 根据 IL-13 数据绘制标准曲线。确定未知样品中 IL-13 的浓度。确保未知样品的数据点落在标准曲线的线性范围内。

参考文献：McKenzie *et al.*，1993；Wills-Karp *et al.*，1998

撰 稿 人：Angus Lauder and Andrew N. J. McKenzie

单元 5.5　IL-15 的检测

基本方案

ELISA 方法可被用来检测培养上清和血清样品中的人 IL-15。这种方法也可用来检

测猴的 IL-15，但必须使用重组猴 IL-15 作为标准来修正所得数据。

材料（带√项目见附录 1）

包被抗体：纯化的抗人 IL-15 单克隆抗体 M111（Genzyme）

√PBS

PBS/Tween 20：0.05%（V/V）Tween 20，PBS 配制

样品稀释液：含有 0.5 mol/L NaCl 和（对血清样品）5%（V/V）普通鼠血清（Life Technologies）的 PBS/Tween

≥20μg/ml 重组人 IL-15 标准品（Genzyme）

待测培养上清或血清样品（−70℃保存以维持稳定性）

二抗：兔抗人 IL-15 多克隆抗体（如 Immunex）

二抗稀释液：含有（对血清样品）5%（V/V）普通小鼠血清（Life Technologies）的 PBS/Tween

辣根过氧化物酶（HRP）偶联的驴抗兔 IgG（Jackson Immunoresearch）

TMB 过氧化物酶底物溶液（Kirkegaard&Perry）

1mol/L H_3PO_4（室温保存不超过 1 年）

检测板：96 孔平底微量板（如 Nunc MaxiSorp）

微量板洗涤仪（如 Nunc；可选）

微量滴定板读板仪（酶联仪）

ELISA 分析软件（如 BioMetallics 的 DeltaSoft）

1. 用 PBS 稀释包被抗体至浓度为 5μg/ml（使用新鲜稀释的包被抗体）。加入 100μl 到检测板每个孔中，盖上盖子，2～8℃过夜孵育。
2. 倒出板中液体，在微量板洗涤仪上用室温的 PBS/Tween 洗板 6～8 次，每次洗涤要确保孔中加满洗涤液。甩出残留液体。也可以用洗瓶加 PBS/Tween 到孔中并甩出液体。
3. 在包被好的微孔板上加入 100μl 样品。将 IL-15 标准品稀释到 800pg/ml，在第一排第一孔加入 100μl（仅使用新稀释的标准品）。轻轻吹打混匀。用新的吸头移入 100μl 到同一列的下一孔中。按照 1∶2 倍比稀释重复 7 孔，第 8 孔作为稀释液对照。
4. 每个待测样品，第一个孔中加入 100μl，然后进行 4 次倍比系列稀释（每孔最终体积应为 100μl）。对于血清样品，每个样品稀释液中应含有 5%普通小鼠血清。

   血清样品可能含有能识别包被抗体的抗鼠 Ig 抗体。

5. 盖上盖子，室温孵育 60min。按步骤 2 洗板。
6. 用抗体稀释液按 1∶2000 稀释二抗，每孔加 100μl。血清样品应含有 5%普通小鼠血清。盖上盖子，室温孵育 60min。按步骤 2 洗板。
7. 用 PBS/Tween 按 1∶1000 稀释 HRP 偶联的驴抗兔 IgG，每孔加 100μl。盖上盖子，室温孵育 60min。按步骤 2 洗板。
8. 根据生产商说明准备好 TMB 过氧化物酶底物溶液，每孔加 100μl。室温孵育 10min。每孔加 100μl 1mol/L H_3PO_4 终止显色过程。
9. 用酶联仪在 OD_{450} 处读数并用 DeltaSoft 软件或相似软件分析数据。也可以手绘标准曲

线或用简单的图形软件绘制标准曲线，根据标准曲线确定待测样品中 IL-15 的浓度。

参考文献：Grabstein *et al*.，1994

撰 稿 人：Raymond J. Paxton

单元 5.6　IL-18 的检测

基本方案

新合成的 IL-18 是无信号肽的前体分子，被酶解后才能活化。在本 ELISA 方法中，为了只检测成熟（活化）的 IL-18，包被抗体必须对活化的 IL-18 具有特异性。一些细胞（如人 PBMC）在正常条件下也可以分泌 IL-18 前体，这些细胞的培养上清液可以被用来检测一种或两种形式的 IL-18。使用抗人或小鼠 IL-18 的单克隆抗体的混合物可检测 IL-18 前体和（或）成熟形式。在本方案中，人 IL-18 的抗体只对活化的 IL-18 具有特异性，抗小鼠 IL-18 抗体可检测两种形式的小鼠 IL-18。

材料（带√项目见附录 1）

ELISA 包被抗体（MBL International）：小鼠抗人 IL-18 单抗（克隆 125-2H）或大鼠抗小鼠 IL-18 单抗（克隆 74）

√PBS，pH 7.4

洗液：Dulbecco 磷酸缓冲盐水（D-PBS，如 Life Technologies）含 0.01%（*V/V*）Tween 20；室温可保存 1 周。

封闭液：D-PBS 含 1%牛血清白蛋白（BSA）；4℃可保存 4 周

IL-18 参考标准（MBL International）

√检测缓冲液

含 IL-18 的待测样本

过氧化物酶标记的大鼠抗人 IL-18 单抗（159-12B，MBL International）或过氧化物酶标记的大鼠抗小鼠 IL-18 单抗（93-10C，MBL International）

√偶联缓冲液

检测过氧化物酶的显色底物，如四甲基对二氨基联苯（tetramethylbenzidine，TMB）/H_2O_2（Becton Dickinson），按厂商说明书配制

适当的终止液，如 2mol/L 硫酸

多通道移液器和分液器

检测板：96 孔 EIA 板和板盖（如 Costar 的 EIA/RIA 板）

ELISA 读板仪（如 Benckmark，Bio-Rad）和适合底物颜色的滤光片

1. 融化 ELISA 包被抗体储存液。用 pH7.4 的 PBS 稀释抗体到 5μg/ml（小鼠抗人 IL-18 单抗，克隆 125-2H）或 15μg/ml（大鼠抗小鼠 IL-18 单抗，克隆 74）。
2. 用多通道移液器，立即向检测板中加入稀释的包被抗体，每孔 100μl。加盖 4℃包被过夜。

3. 洗板 4 次：快速吸去或倒去孔内容物，再加满洗液。
4. 每孔加 200μl 封闭液，37℃孵育 1h 或 4℃放置过夜。
5. 用检测缓冲液稀释 IL-18 参考标准品到 1000pg/ml。取 5 支 1.5ml 微量离心管，2 倍稀释标准品到 31.2pg/ml。
6. 用检测缓冲液稀释待测样本。样本起始浓度应为 100～1000pg/ml。取 5 个 1.5ml 微量离心管，2 倍稀释样本。

   样本来源不同，稀释度也不同。研究者可根据经验或做预实验加以确定。

7. 如步骤 3，洗涤抗体包被的检测板 4 次。
8. 每孔加 100μl 稀释的 IL-18 标准品或稀释的样本，每个稀释度加 2 孔。至少另有 2 孔各加 100μl 检测缓冲液以决定背景。室温（20～25℃）放置 2h。如步骤 3，洗涤检测板 4 次。
9. 用偶联缓冲液稀释过氧化物酶标记抗体（159-12B 或 93-10C）到 0.5μg/ml。每孔加 100μl，室温（20～25℃）放置 2h。如步骤 3，洗涤检测板 4 次。
10. 最后一次洗板后，立即向每孔加入 100μl 显色底物，室温放置 30min。
11. 每孔加入 100μl 终止液，室温中，30min 内在 ELISA 读板仪上读板，根据底物特点选择适当的滤光片。
12. 根据标准品的光吸收值（OD）绘制标准曲线（OD 值对 IL-18 的 pg/ml 绘图）。根据标准曲线计算待测样本中 IL-18 的含量（细胞因子 ELISA 的结果计算见单元 5.2）。

参考文献：Nakanishi *et al.*，2001；Okamura *et al.*，1995

撰 稿 人：Tomohiro Yoshimoto，Hiroko Tsutsui，Haruki Okamura，and Fenji Nakanishi

单元 5.7　γ 干扰素的检测

基本方案

材料（带√项目见附录 1）

纯化的特异性抗 IFN-γ 单抗（Genzyme ＃1598-00，抗人 IFN-γ；＃1222-00，抗小鼠 IFN-γ）
√碳酸盐包被缓冲液
IFN-γ 标准品（高纯，如 Genzyme ＃HG-IFN，抗人 IFN-γ；＃MG-IFN，抗小鼠 IFN-γ）
样品缓冲液：PBS（附录 1）含 5％（*V*/*V*）FCS（56℃热灭活 30min）
√ELISA 洗液
山羊或兔抗 IFN-γ 多克隆抗血清（Genzyme）
过氧化物酶标记的抗山羊 Ig 抗体或抗兔 Ig 抗体（US Biochemical ＃1144H，兔抗山羊；＃1251H，山羊抗兔）（根据抗 IFN-γ 多克隆抗血清的种属来源选定）
√底物缓冲液
√过氧化物酶底物溶液

多通道移液器

检测板：96 孔平底 Immulon 2 ELISA 板和板盖（Dynatech Laboratories ＃011-010-3450）

96 孔 V 形底微量滴定板

ELISA 板洗板器（可选 Bio-Rad 1550）

酶联仪和 414nm 滤光片

注： Genzyme 公司有售包括所有缓冲液、抗体和试剂的试剂盒，可检测人 IFN-γ（＃1556-00）或小鼠 IFN-γ（＃1557-00）。ATCC 有售能产生抗小鼠 IFN-γ 的特异性 IgG1 单抗的大鼠杂交瘤细胞（RA-6A2＃HB170）。不久将有能产生抗人 IFN-γ 单抗的其他杂交瘤细胞。

1. 用碳酸包被缓冲液将纯化的抗 IFN-γ 单抗稀释到 3.5μg/ml。
2. 用多通道移液器，向检测板的每孔中加入 100μl 单抗稀释液。用板盖盖板，37℃孵育 2h 或 4℃放置过夜（包被过夜可增加敏感性）。
3. 如下在另一块 96 孔 V 形底板（稀释板）中系列稀释 IFN-γ。在 1～3 列的 B～H 行的每孔中加 125μl 样本缓冲液；A 行加 250μl IFN-γ 标准品 [浓度为 100 国际参考单位（IRU）/ml，含 3.3ng/ml 人 IFN-γ 或 10ng/ml 小鼠 IFN-γ]。用多通道移液器从 A 行各孔分别转移 125μl 液体到 B 行各孔，吹打混匀。如此重复倍比稀释标准品直到 G 行各孔，从 G 行各孔吸弃 125μl 液体。A～G 行的浓度从 100IRU/ml 到 0.78IRU/ml。H 行是空白对照。

   纯化的重组 IFN-γ 是最好的标准品。如果先用商品化 IFN-γ 标准品滴定，含 IFN-γ 的活化 T 细胞培养上清液也可作为标准品。标准品和待测样本必须种属相同且具有相同的单抗特异性。

4. 在 4～6 列，A 行的每孔加 175μl 待测样本之一，B～D 行加 140μl 样本缓冲液。用多通道移液器从 A 行各孔分别转移 35μl 液体到 B 行各孔，吹打混匀。如此重复 5 倍稀释标准品直到 D 行各孔，从 D 行各孔吸弃 35μl 液体。因此待测样本稀释了 125 倍，每个稀释度 3 个复孔。
5. 同样稀释其他待测样本，每个样本 3 列×4 行。
6. 用 ELISA 洗液洗涤已包被的检测板 6 次，可用 ELISA 洗板器。如果需要保存，每孔加 100μl ELISA 洗液后加盖，检测板可在 4℃保存 2 周。
7. 在吸水纸上拍干检测板。用多通道移液器从稀释板转移 100μl 稀释液到检测板对应各孔。37℃孵育 1h 或 4℃放置过夜（过夜孵育可增加敏感性）。

   在洗液中加入 Tween 20 可减去封闭步骤。

8. 用 ELISA 洗液洗涤检测板 6 次，在吸水纸上拍干检测板。
9. 用样本缓冲液稀释抗 IFN-γ 多克隆抗血清 500～5000 倍，每孔加 100μl，加盖后室温（20～25℃）放置 1h。用 ELISA 洗液洗涤检测板 6 次，在吸水纸上拍干检测板。

   多克隆抗血清的稀释倍数需要根据经验确定。也可用能对 IFN-γ 标准品产生最大线性 OD 反应且最低背景的多克隆抗血清的稀释倍数定为最适浓度。

10. 用样本缓冲液稀释过氧化物酶标记的抗山羊 IgG 或抗兔 IgG 抗体 2000～10 000 倍，每孔加 100μl，加盖后室温（20～25℃）放置 1h。用 ELISA 洗液洗涤检测板 6 次，

在吸水纸上拍干检测板。

注解同步骤 9。

11. 每孔加 100μl 过氧化物酶底物缓冲液，室温放置 30min～2h。在 414nm 波长处读取 OD 值（阳性孔呈绿色）。
12. 根据标准品的光吸收值（OD）在半对数纸上作标准曲线（OD 值对 IFN-γ 浓度绘图）。根据待测样本 OD 值对应标准曲线线性区的稀释度确定待测样本中 IFN-γ 的含量。用该点的标准品浓度乘以该点待测样本稀释度的倒数即为原始样本中所含 IFN-γ 的浓度，要注意平均该样本的全部数值。

参考文献：Schreiber *et al.*，1985；Trinchieri and Perussia，1985

撰 稿 人：Robert D. Schreiber

单元 5.8　流式细胞仪检测细胞内因子

基本方案　细胞内因子的荧光标记

本单元介绍用 4 色荧光分析 $CD4^+$ T 细胞内表达 IFN-γ、IL-4、IL-2 水平的方法（可用于计算 Th1 和 Th2 细胞比例）。根据细胞类型、待测的细胞因子以及现用流式细胞仪的配置，研究者可以限定所要检测的指标为 2 或 3 种参数。细胞内荧光标记的一个主要障碍是由于固定和渗透导致的抗体非特异性结合的增加。严格滴定所需抗体浓度，用惰性蛋白如 BSA、血清或者脱脂奶粉都可以但并不能完全消除非特异性结合。确定特异性结合还需要设置一些合适的对照（见辅助方案 5）。

注意：Saponin 是可逆性的渗透剂，必须存在于所有的标记和清洗过程中。在标记过程中，最佳的抗细胞因子抗体浓度不是一成不变的，因此需要每个研究者确定所需的抗体用量。

材料（带√项目见附录 1）

经过激活、固定、冻存的细胞（见辅助方案 1～3）

√PBS-S

√PBS-S/牛奶

荧光标记的抗细胞因子抗体（直接标记用，如 FITC-偶联的抗 IFN-γ 和 PE-偶联的抗 IL-4；B. D. Bioscience 公司，B. D. Pharmingen 公司，Caltag，Biosource 公司）

同型对照

√PBS/BSA

37℃水浴

荧光标记用的 4ml V 形底试管（Sarstedt）

1. 37℃水浴复苏已经活化、固定的冻存细胞。加入 1ml PBS-S 于每个样品，转移 2×10^6 个细胞至 4ml V 形底试管。

2. 4℃，1500g 离心 10min。弃上清。
3. 加入 50μl 的 PBS-S/牛奶，上下颠倒试管重悬细胞。冰上孵育 30min。
4. 将细胞分到试管中，4℃，1500g 离心 10min。弃上清。

    每 4×10^6 个经佛波醇豆蔻酸乙酸盐（PMA）-离子霉素（ionomycin）活化的细胞可以分成 4～8 份样品，而一支同样数量的经抗原活化的细胞仅能分成 2 份样品。

5. 准备抗体混合物，即用 PBS-S/牛奶稀释到合适浓度（每种抗体的浓度通常为 0.5～2.5μg/ml）。加入 50μl 的抗体混合物于每个试管，反复敲打管壁混合细胞。对于每份样品，制备同型抗体对照。
6. 避光，4℃孵育 30min。
7. 加入 1ml 的 PBS-S 于每个试管，振荡。4℃，1500g 离心 10min。弃上清。敲打管底弹开细胞。
8. 重复步骤 7。
9. 用 300～600μl 的 PBS/BSA 重悬细胞。在 24h 内进行流式细胞仪分析。根据活化的细胞类型和阳性细胞的期望频率，确定获取的细胞数量。

辅助方案 1 PMA 和 ionomycin 激活 T 细胞

PMA 和 ionomycin 是活化人和小鼠 T 细胞的经典方法，以下讲述的方案均适用于人和小鼠来源的 T 细胞（分别见单元 8.8 和单元 2.11）。尽管下面以人 PBMC 为例，但是小鼠脾细胞（单元 2.1）也可以应用该方案，用全血也可以获得相似的结果。

PMA 和 ionomycin 是刺激多种 T 细胞因子产生的最强活化剂。Bredfeldin A 抑制细胞因子分泌，因此能够增加细胞因子留存在细胞内的数量，改善信噪比。PMA/ionomycin 也能够引起一定的细胞死亡，因此会释放一些 DNA 使制备物中黏度增加，引起细胞成团。这种情况可以应用 DNase I 短暂处理消除。

材料（带√项目见附录 1）

√RPMI-10 完全培养基，37℃

溶于100%乙醇的 200μg/ml 佛波醇豆蔻酸乙酸盐（PMA），保存在－20℃。溶于二甲基亚砜（DMSO）的 10mmol/L（7.5mg/ml）的离子霉素（ionomycin）（Ca^{2+} 盐），保存在－20℃

溶于 DMSO 的 10mg/ml 的 BrefeldinA（BFA），保存在－20℃

溶于PBS（见附录 1）的 3mg/ml 的 DNase I（60 000Dornase U/ml；Calbiochem 公司）；可选用

4ml 和 15ml V 形底试管

24 孔组织培养板

37℃，5%CO_2 培养箱

细胞刮或移液管

1. 准备 PBMC（单元 8.10）。如果需要保留一段时间再进行检测，可以放置在 4℃ RPMI-10 培养基中过夜，浓度在 4×10^6～20×10^6 个细胞/ml。
2. 重悬细胞于 37℃预热的 RPMI-10 培养基，浓度为 4×10^6 个细胞/ml。接种细胞于 24

孔组织培养板，每孔 1ml。

3. 每 5ml 的 37℃ 预热的 RPMI-10 培养基中加入 1μl 的 200μg/ml 的 PMA、1μl 的 10mmol/L 的 ionomycin 和 10μl 的 10mg/ml 的 BFA。在 15～30min 内使用，混匀。

   警告：操作 PMA、ionomycin、BFA 时应戴手套。

4. 加入 1ml 的培养基于每孔（含浓度为 2×10^6 个细胞/ml 的细胞，20ng/ml 的 PMA，1μmol/L 的 ionomycin 和 10μg/ml 的 BFA）。

   也可以刺激 2×10^7 个细胞/10ml 于 6 孔板或者 4×10^5 个细胞/200μl 于 96 孔板。

5. 于 37℃，5% CO_2 培养箱中孵育 6h。该培养时间适合于 IL-4 和 IL-5，对于 IL-2 和 IFN-γ 算是折中。

6. 可选择操作：加入 40μl 的 3mg/ml DNase I 于每孔（终浓度为 3500Dornase U/ml），37℃孵育 5min。

7. 用细胞刮或者移液管处理贴壁细胞。转移细胞至 4ml V 形底试管。上下吹打细胞，打散细胞团。

8. 4℃，300*g* 离心 10min，固定细胞（见辅助方案 3）。如果待测的细胞表面标志对多聚甲醛固定剂敏感，在固定前遵照辅助方案 4 进行标记。

辅助方案 2　抗原活化 T 细胞

较 PMA/ionomycin，抗原代表了生理性的刺激。下面以结核杆菌为例，也可以应用其他抗原（如巨细胞病毒、过敏原）。抗原呈递过程可被转运抑制剂如 BFA 或者莫能霉素抑制。

材料（带√项目见附录 1）

√RPMI-10 完全培养基，37℃

抗 CD28（人：BD Biosciences L293 克隆、BD Pharmingen 和 Beckman-Coulter-CD28.2 克隆、YTH913.12 克隆；小鼠：BD Pharmingen37.51 克隆）

10mg/ml 的热灭活结核菌素，H37Ra 菌株（BD Biosciences）

溶于 DMSO 的 10mg/ml 的 BrefeldinA（BFA），保存在−20℃

溶于PBS（见附录 1）的 3mg/ml 的 DNase I（60 000Dornase U/ml；Calbiochem 公司）；可选择溶于 PBS 的 0.1mol/L 的 EDTA

16mm×125mm 的聚苯乙烯培养管（Corning 公司）

37℃，5% CO_2 培养箱

4ml 聚丙烯或者厚壁聚丙烯 V 形底试管

1. 准备 PBMC（单元 8.10），重悬细胞于 37℃ 预热的 RPMI-10 完全培养基，浓度为 2×10^6 个细胞/ml。

2. 加入抗 CD28 至终浓度为 1μg/ml，吹打混匀。转移 2ml 细胞于 16mm×125mm 的圆底聚苯乙烯组织培养试管。

3. 加入 10mg/ml 的热灭活结核菌素至终浓度 10μg/ml，混匀。最适抗原浓度应预先确定。

4. 室温，300*g* 离心 5min。拧松管帽，直立放置 37℃，5% CO_2 培养箱中孵育 2h。

5. 用 RPMI-10 完全培养基稀释 10mg/ml 的 BFA 至 200μg/ml（1∶50 稀释）。轻轻地

加入 100μl 到每支试管（终浓度为 10μg/ml），不要扰动细胞沉淀。37℃孵育 4h。

最佳的终止时间和条件需要预先确定。

6. 可选择操作：加入 40μl 的 3mg/ml DNase I 于每孔（终浓度为 3500Dornase U/ml），37℃孵育 5min。
7. 加入 200μl 的 0.1mol/L EDTA 于每孔，室温孵育 5min。上下吹打贴壁细胞，小心避免气泡产生。转移细胞至 4ml V 形底试管。
8. 4℃，300*g* 离心 10min，固定细胞（见辅助方案 3）。如果待测的细胞表面标志对多聚甲醛固定剂敏感，在固定前遵照辅助方案 4 进行标记。

辅助方案 3　固定和冻存 PBMC

材料（带√项目见附录 1）

√4%（*m/V*）多聚甲醛（PFA）

活化的 PBMC（见辅助方案 1 或 2）或者活化的表面标记细胞（见辅助方案 4）

√PBS，4℃

√PBS/BSA，4℃

10%（*V/V*）试剂级 DMSO，于 PBS，4℃

4ml 聚苯乙烯 V 形底试管

2ml 冻存管

1. 溶化 4%PFA 于 37℃水浴 10min。振荡溶解任何可见沉淀。
2. 转移活化的 PBMC 至 4ml 聚苯乙烯 V 形底试管，4℃，300*g* 离心 10min。弃上清，勿扰动细胞沉淀。敲打试管底部，打散细胞团块。
3. 加入 1ml 冰冷 PBS，振荡混匀。4℃，300*g* 离心 10min。弃上清。敲打试管底部，打散细胞团块。
4. 加入 500μl 的预温的 4%PFA，室温孵育 5min，定时振荡细胞，避免细胞成团。
5. 加入 2ml 冰冷 PBS/BSA，混匀。4℃，1500*g* 离心 5min。弃上清。
6. 重悬细胞沉淀于 0.5ml 的 10%DMSO/PBS。分装 4×10^6 个细胞至 2ml 冻存管。可在 −80℃ 保存 1～2 年。

辅助方案 4　PBMC 的细胞表面标记

材料（带√项目见附录 1）

待标记的活化细胞（见辅助方案 1 或 2）

√PBS/BSA，4℃

PE-Cy5 或 PerCP/Cy5.5 偶联的抗人 CD4 单抗（Sigma，BD Biosciences，Caltag）或其他感兴趣的抗细胞因子单抗

√PBS，4℃

4ml V 形底聚苯乙烯试管（Sarstedt）

血细胞计数板

注意：所有清洗和孵育过程在冰上操作以减少细胞内因子的分泌。

1. 转移活化细胞至4ml V形底聚苯乙烯试管，4℃，300g离心10min。弃上清。敲打试管底部，打散细胞沉淀。
2. 重悬细胞于1ml的冰冷PBS/BSA。用血细胞计数板计数细胞。
3. 分装4×10^6个细胞至合适数量的4ml V形底试管。4℃、300g离心10min。弃上清。
4. 准备荧光素偶联的CD4单抗于200μl的PBS/BSA，至期望浓度。单抗放置于冰上。
5. 加入200μl的单抗于细胞沉淀，反复吹打重悬细胞。避光冰浴20min。
6. 加入1ml的冰冷PBS，温和振荡。4℃，300g离心10min。弃上清。敲打管底弹开细胞。
7. 按照辅助方案3的步骤4～6完成清洗和固定。

辅助方案5　用荧光标记的抗细胞因子抗体标记活化细胞内的细胞因子

为了检测细胞内细胞因子的特异性，每支样品管都需要设置相应的对照管。一种选择是应用同型对照抗体。另外可选择的是，应用10～1000倍过量的重组细胞因子在标记前加入到抗细胞因子抗体中；然而这种方法需要大量昂贵的细胞因子。更为灵活和经济的方法是，预先将阴性对照样品与过量的荧光染料未偶联的抗细胞因子抗体孵育。特异性标记样品同样地用等量无关同型对照抗体处理。然后将等量的荧光染料偶联的直标抗体再加入到这两支试管中。这种方法提供了阴性对照，因为特异性结合已经被过量的未偶联的抗体封闭，但是相对于对照封闭的样品，非特异性结合并未受影响。该方案以未偶联荧光的抗IFN-γ、抗IL-4和抗IL-2为例。

附加材料（其他材料见基本方案）

未偶联荧光的和FITC偶联的抗IFN-γ单抗
未偶联荧光的和PE偶联的抗IL-4单抗
未偶联荧光的和APC偶联的抗IL-2单抗
未偶联荧光无关同型对照抗体（与每种抗细胞因子抗体匹配）

注意：所有以上抗体可从BD Bioseceinces，BD Pharmingen，Caltag，Biosource，R&D Systems和eBiosceince获得。

1. 准备并用PBS-S/牛奶封闭的细胞（见基本方案步骤1～3）。将细胞分成2份25μl体积于2支4ml试管。4℃，1500g离心10min。弃上清。
2. 用50μl PBS-S/牛奶含有100μg/ml的未偶联荧光特异性抗IFN-γ、抗IL-4和抗IL-2单抗的混合物重悬细胞。在第二管，用50μl PBS-S/牛奶含有100μg/ml与每个特异性细胞因子抗体同型的未标记抗体混合物重悬细胞。
3. 如果添加单抗使Saponin稀释至<0.06%，加入所加抗体1/10体积的10×Saponin。
4. 4℃孵育1h。
5. 在所有管中加入FITC标记的抗IFN-γ单抗、PE标记的抗IL-4单抗和APC标记的抗IL-2单抗至合适浓度。4℃避光孵育30min。
6. 清洗和进行流式细胞仪分析见基本方案步骤7～9。

参考文献：Prussin and Metcalfe，1995

撰 搞 人：Barbara Foster and Calman Prussin

单元 5.9　流式细胞仪检测细胞因子受体

图 5.9.1 显示了直接、间接（2 步法）和 3 步免疫荧光标记，和用细胞因子作为配体检测其受体。

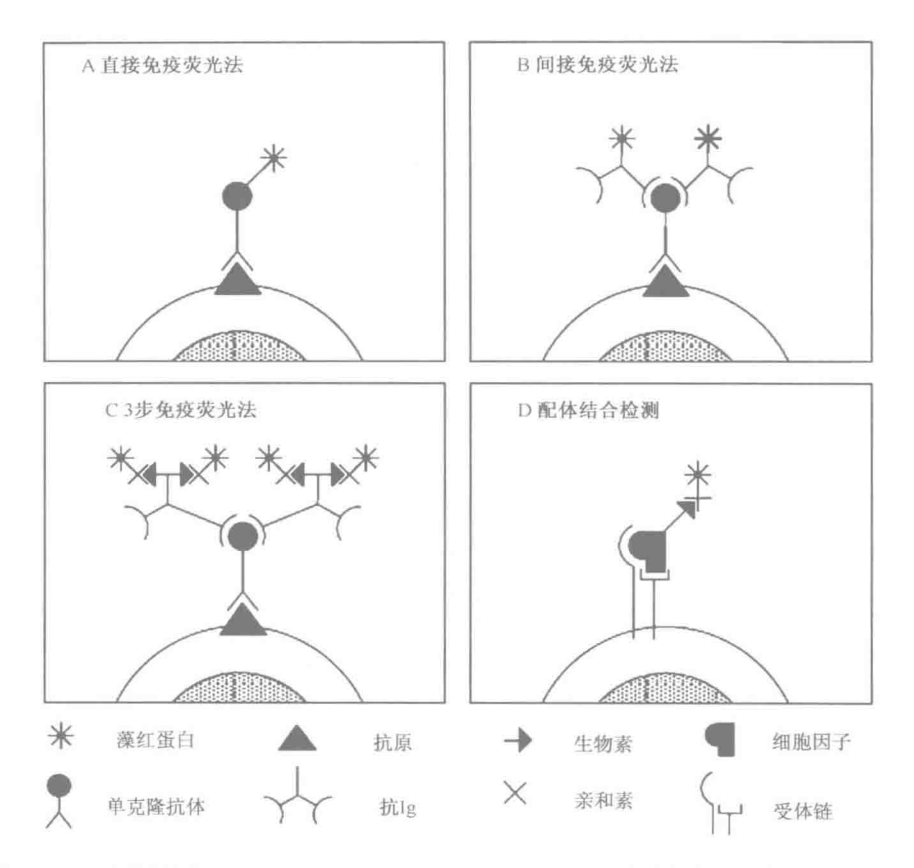


图 5.9.1　受体检测法。A. 直接免疫荧光法：在受体丰度高或者抗体结合相当高的情况下采用荧光染料-偶联的抗体进行。B. 间接免疫荧光法：增加荧光强度。C. 3 步免疫荧光法：进一步增强荧光强度。配体结合检测（D）：检测功能性受体（但信号弱）。

警示：当进行人血、细胞或者感染性试剂，应遵照生物安全进行操作。

注意：为了减少抗原的丢失和抗原抗体复合物的分离，保证细胞和试剂在低温条件下操作。

基本方案　用抗受体单克隆抗体检测人和小鼠的细胞因子受体

该方案描述了人 PBMC 的标记方法，但也可以用于人单个核细胞亚群（第八章）或者标记后再溶红的全血分析（单元 8.7）。也适用于小鼠和大鼠细胞的标记（见单元 2.1 分离小鼠脾淋巴细胞）。在研究小鼠细胞时，用大鼠来源针对小鼠抗原的单抗，采用一种单抗或者多克隆小鼠抗大鼠 Ig 用于检测（Pharmingen 或者 Jackson Immunore-

search)。不要使用其他物种来源的抗 Ig（如羊抗大鼠 Ig），因为它可能会与小鼠的 Ig 发生交叉反应。在研究小鼠细胞时，可用小鼠血清封闭。为了最大限度提高灵敏度，在预实验中需要优化每种试剂（见辅助方案 1 和 2）。

对照应该包含实验过程中会导致非特异性结合的每种成分，最好采用与抗细胞因子受体单抗同型的，但又不会特异性结合靶细胞的单抗。阴性对照应该包含检测系统的每种成分，应该在每一次实验中都设置。阴性对照的结果用来衡量获得的特异性细胞因子受体结果的可靠性。不推荐采用从特异性细胞因子受体信号中减去阴性对照的信号的这种方式，因为小的差异不太可能具有生物学意义。

材料（带√项目见附录 1）

肝素抗凝的人外周血样品（附录 3G）

√PBS/叠氮钠，4℃

小鼠来源抗人细胞因子受体单抗（表 5.9.1），浓度经滴定确定（见辅助方案 1）

表 5.9.1　抗人和小鼠细胞因子受体单克隆抗体

细胞因子受体[a]	CD 抗原[b]	供应商[c]	
		人	小鼠
IL-1R (p80) 1 型	CD121a	GN，PG	GN，PG
IL-1R 2 型	CD121b	GN	PG
IL-2Rα	CD25	多种公司	多种公司
IL-2Rβ	CD122	BD，CI，PG	EN，PG
IL-2Rγ（共同链）	CD132	PG	PG
IL-3Rα	CDw123	PG，SA	PG
IL-3R/IL-5R/GM-CSF 共同受体	CDw131	PG，SA	
IL-4R	CD124	GN，CI	GN
IL-5R	CDw125	PG	
IL-6R	CD126	BS，ST，CI	GN，PG
gp 130	CD130	ST，PG	
IL-7R	CD127	GN，CI	
IL-8R	CDw128	PG	
TNFRp55	CD120a	GN	
TNFRp75	CD120b	GN	
IFN-γR	CDw119	GN，PG	PG
GM-CSFR	CDw116	PG，CI，SA	
G-CSFR		SA	
c-kit，*scf* 受体	CD117	CI	PG
FAS/APO-1	CD95	PG，CI	PG
OX40	CD134	PG	
Flt3/Flk2/STK1	CD135		PG
ID1/ID2/MSP-R	CDw136		
4B4	CDw137	PG	PG

a. 简略写：G-CSF，粒细胞集落刺激因子；GM-CSF，粒细胞单核细胞集落刺激因子；gp130、IL-6、LIF 和 IL-11 受体的 130kDa 糖蛋白信号转导链；IL-1R，白细胞介素 1 受体；IL-2Rα，白细胞介素 2 受体 α 亚基；IFN-γR，干扰素 γ 受体；LIF，白血病抑制因子；SCF，干细胞因子；TNFR，肿瘤坏死因子受体。

b. 第五届和第六届国际人白细胞分化抗原工作会议确定的 CD 序号（Schlossman *et al*.，1995；Ishii *et al*. 1997）。

c. 供应商：BD，Becton Dickinson Immunocytometry Systems；BS，Bioscource International；CI，Coulter Immunotech；EN，Endogen；GN，Genzyme；PG，Pharmingen；SA，Silenius/Amrad；ST，Serotech。见附录 4 查询供应商地址。目前获得新型抗体变得更加容易；有必要查询主要的供应商。

同型匹配阴性对照抗体，浓度同抗受体抗体

2∶1（V/V）正常马血清/正常人血清

种特异性生物素化抗 Ig 抗体（如马抗小鼠 Ig、Vector Labs 或者 Silenus Lab），浓度经滴定确定（见辅助方案 2）

藻红蛋白偶联的链亲和素（PE-SA；如 Caltag 或者 Sigma），浓度经滴定确定（见辅助方案 2）

10ml 或 20ml 的培养瓶

流式细胞检测用试管（如 Falcon 的聚苯乙烯 12mm×75mm 的圆底试管）和管架

桌式离心机和转头（如 Beckman TJ-R 带有 TH-4 转头），4℃

1. 分离人外周血单个核细胞（单元 8.1）。冷的 PBS/叠氮钠悬浮 1×10^7 个细胞，置于 10ml 或者 20ml 培养瓶，冰浴。在准备细胞过程中，标记反应试管和试管架应至于溶化的冰水中。

   细胞在 3h 内应尽可能使用。细胞可以在室温保存过夜，但是应该在储存前后用一定量的细胞检测是否有受体丢失。

2. 加入合适量的单抗于试管中，冰浴。包括同型对照。
3. 充分且温和地混匀细胞（尽量不使用振荡器）。加入 50μl 的抗体，温和混匀，冰浴 30min，15min 分散沉淀的细胞一次。
4. 加入 3ml 冷 PBS/叠氮钠，4℃，200g 离心 5min。弃上清，在不扰动细胞的情况下，尽可能减少残留液体。悬浮细胞于 100μl 的冷 PBS/叠氮钠，加入另外的 3ml 冷 PBS/叠氮钠，混合。重复离心并弃上清。

   彻底、小心地弃除上清至关重要，因为这一步的可变性会导致下一步操作中试剂的稀释，造成结果的变异。

5. 在 50μl 的冷 PBS/叠氮钠中充分悬浮细胞，加入 15μl 2∶1（V/V）马血清/人血清。室温孵育 10min，然后转至冰浴。
6. 加入 50μl 稀释的生物素化马抗小鼠 Ig，温和混匀。如步骤 3 孵育，步骤 4 清洗。

   生物素化 Ig 需预先滴定，但是 1/100 稀释的载体马抗小鼠在本实验室进行的实验中属于最佳实验条件。

7. 加入 50μl 的预先滴定的 PE-SA，混匀。如步骤 3 孵育，步骤 4 清洗。

   PE-SA 需预先滴定，但是 1/50 稀释的 Caltag 试剂或者 1/20 稀释的 Sigma 试剂在本实验室进行的实验中属于最佳实验条件。

8. 当日分析，悬浮细胞于 100～200μl 的冷 PBS/叠氮钠。有必要的话，调整体积，使细胞在流式细胞仪中的上样速度在 500 个细胞/s。如果要推迟分析，悬浮细胞应用 100～200μl 固定液固定（单元 4.1），有必要的话，调整细胞浓度。建议第二天分析，或者在一周内分析。
9. 进行流式细胞仪分析（见第四章）。通过物理参数对感兴趣的细胞设门，分析其表达强弱。

备选方案 1　用标记的细胞因子检测细胞因子受体

对于多亚基受体，用生物素化的细胞因子检测会给出不同于应用抗单个亚基抗体的

重要的信息。

附加材料（其他材料见基本方案）

生物素化的细胞因子（如 R&Dsystem、Genzyme 或者 Pharmingen），浓度经滴定后确定（见辅助方案 1）

1. 准备实验细胞（见基本方案，步骤 1）。
2. 用最适浓度的生物素化细胞因子混匀细胞。冰浴 30min，15min 时混匀细胞避免细胞成团。
3. 清洗细胞（见基本方案，步骤 4）。
4. 进行 PE-SA 标记和流式细胞仪分析（见基本方案，步骤 7～9）。标记后立即分析，无需固定。细胞因子/受体复合物能够经受固定操作。

备选方案 2　多参数分析检测淋巴细胞亚群细胞因子受体的表达

在进行两种抗原的表达分析时，如一种为细胞因子受体，另一种为一种类型细胞或者某种类型细胞的特定亚群标志，通常采用 FITC 和 PE 组合。PE 用于细胞因子受体，因为细胞因子受体的丰度较低，而 PE 比 FITC 有更强的激发系数和光子能量（表 5.9.2）。这种组合可能会减少 PE 通道的灵敏度，因为 FITC 的发射光谱和 PE 的发射光谱有部分重叠，导致 PE 通道检测需要采用更为狭窄的带通。利用 PE-Cy5 代替 FITC 作为第二色，可以减少光谱重叠和灵敏度的丢失；然而，PE-Cy5 有可能发射 PE 通道荧光，因此需要验定。PE-Cy5 偶联的试剂较 PE/texas 红更好，因为它们与 PE 的重叠更少。PerCP（Becton Dickinson Immunocytometry Systems）是另外一个备选，但是其灵敏度低。对于 3 色分析，PE（针对低丰度抗原）、FITC、PE/Cy5 或者 PerCP 组合是常规选择。选用 FITC 和 PE/Cy5（或者 PerCP）常受制于试剂的可获得性。如果 3 个标志中有 2 个的丰度较低，这两个标志应用 PE 和 PE/Cy5。2 色和 3 色分析的举例见表 5.9.3。

表 5.9.2　主要荧光素的光谱特点[a]

荧光素[b]	激发系数/($cm^{-1}M^{-1}$)	光子场	激发波长（λ_{max}/nm）	发射波长（λ_{max}/nm）
FITC	82 000	0.3	495	520
R-PE[c]	2 000 000	0.8	546	580
PE/Cy5	NA	NA	546	667
PerCP	320 000	NA	478	677
Cy3	130 000	>0.15	552	565

a. 要更多信息见 Haugland（1994）；NA，目前无可获得的资料。

b. Cy3 和 Cy5 是 biological Detection Systems 的专有产品，PerCP 是 Becton Dickinson Immunocytometry System 的专有产品；PE/Cy5 是 Cy5 和 PE 偶联物。Cy3 不适合于安装 488 激发器的流式细胞仪用，但是可用于荧光显微镜。

c. 相关的 B-PE 有更高激发系数和光子场，如果在 546～560nm 激发下可以获得更好的效果。然而 R-PE 的激发波长为 488，因此在此激发波长下，R-PE 比 B-PE 效果更佳。

表 5.9.3　人来源细胞的 2 色和 3 色分析[a]

一抗	二抗	三抗	顺序
CD25	CD4-F	—	1. CD25 2. Bi-HαMouse Ig 3. 封闭[b] 4. PE/SA+CD4-F
CDw124	CD19-PE/cy5	—	1. CDw124 2. Bi-HαMouse Ig 3. 封闭[b] 4. PE/SA+CD19（或者 CD19-F）
CD25	CD4-PE/Cy5	CD45RO-F	1. CD25 2. Bi-HαMouse Ig 3. 封闭[b] 4. PE/SA+CD4-PE/Cy5+CD45R0-F
CD122	CD25-PE	CD3-F	1. CD122 2. Bi-HαMouse Ig 3. 封闭[b] 4. PE/Cy5-SA+CD25-PE+CD3-F

a. 简略写和产品名：PE，藻红蛋白；F，异硫氰酸荧光磺；Bi，生物素；SA，链亲和素；HαMouse，马抗小鼠。

b. 有必要封闭马抗小鼠 Ig 上可以结合小鼠 Ig 的未结合的位点。

附加材料（其他材料见基本方案）

正常小鼠血清或者 1mg/ml 正常小鼠 Ig（Sigma）

2 种（可选用）和 3 种 FITC 或 PE/Cy5 偶联的单抗，识别淋巴细胞亚群的特异性标志（如 Caltag、Pharmingen、Sigma 或者 Becton Dickinson Immunocytometry Systems）

PE/Cy5 偶联链亲和素（可选用 PE-SA 代替；Caltag）

1. 准备细胞和标记用抗体和生物素化抗 Ig（见基本方案，步骤 1～6）
2. 悬浮细胞于 5～10μl 未稀释正常小鼠血清或者 1mg/ml 正常小鼠 Ig，冰浴 10min。

   注意：小鼠血清封闭了生物素化抗 Ig 的可以结合二抗和三抗位点（图 5.9.2）。在使用小鼠抗大鼠单抗检测大鼠抗小鼠单抗时，用大鼠血清封闭。
3. 加入二抗、三抗和 PE-SA（或者 PE/Cy5 偶联链亲和素）。孵育 30min，洗细胞（见基本方案，步骤 3 和 4）。
4. 完成流式细胞仪分析（见基本方案，步骤 8～9）。

辅助方案 1　单克隆抗体和细胞因子的滴定

优化主要试剂，如抗体和细胞因子的使用浓度，一般可采用生产商推荐的使用浓度或者根据本单元的方法进行滴定。然后用优化好的主要试剂，再去优化检测试剂（见辅

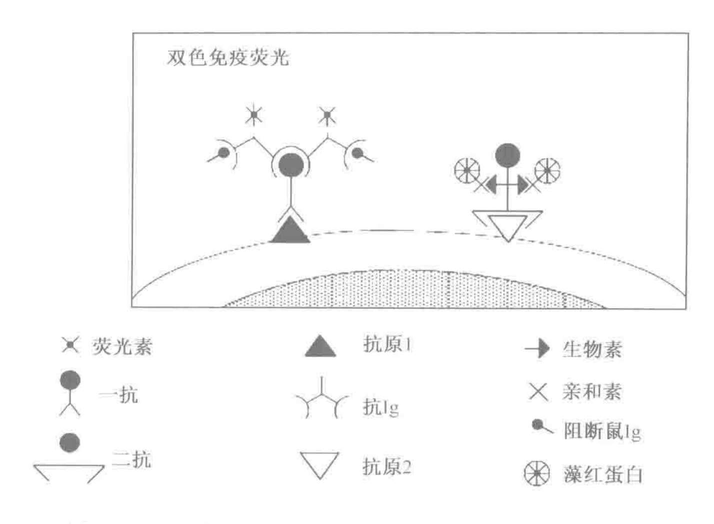


图 5.9.2　2 色分析中封闭结合小鼠 Ig 的游离结合位点。

助方案 2)。最后，用优化的检测试剂去优化细胞因子受体抗体。一旦优化方法建立好，任何新的试剂都可以用已建立的试剂和条件进行优化。

直接偶联的单抗可以采用生产商推荐的浓度，无需滴定。

1. 根据基本方案步骤 1 准备细胞和试管。每个试管分配 50μl 细胞。
2. 用冷 PSB/叠氮钠 2 倍系列稀释一抗或细胞因子。每管加 50μl 稀释后的试剂，混匀。同时同型对照抗体也如上法稀释，加入到阴性对照细胞中。

   如抗体浓度已知，要从 5μg/ml 开始稀释。对于未纯化的腹水，起始稀释 1∶100；对于杂交瘤培养上清，无需稀释。
3. 按照基本方案步骤 4～9 进行标记和流式细胞仪检测分析；对于细胞因子，按照备选方案 1 中步骤 3～4 进行。
4. 依照阳性对照和阴性对照能够达到最佳分离效果选择最适的抗体或细胞因子浓度。

辅助方案 2　评价检测试剂

本方案用于比较试剂批次、储存>1 月的试剂活性和检查流式细胞仪器状态。需要 3 种检测试剂：已知的强抗体（能够区分阳性对照和阴性对照，如抗 CD3）；已知的能够产生双峰分布的低丰度抗体，如抗 CD25；已知的阴性对照。CD3 可以评价总的灵敏度，CD25 和阴性对照的比较可以证实此实验是在必需的灵敏度上运行。

1. 根据基本方案，步骤 1 准备细胞和试管。
2. 根据基本方案，步骤 3～5 标记抗体。用优化好的抗 CD3、CD25 和阴性对照抗体。
3. 准备系列稀释的生物素化抗鼠 Ig（对人）或抗大鼠 Ig（对鼠）。每管加 50μl 稀释后的试剂，混匀。根据基本方案，步骤 3～4 孵育和洗涤。
4. 加 50μl PE-SA（或 PE/Cy5-链亲和素），采用生产商推荐浓度，混匀。根据基本方案，步骤 3～4 孵育和洗涤。
5. 流式细胞仪分析（见基本方案，步骤 8～9）。
6. 根据最佳的分离效果选择适合的抗 Ig 浓度。

7. 用最适浓度的生物素化抗 Ig，重复滴定一系列 PE-SA（或 PE/Cy5-链亲和素）。

参考文献：Zola *et al.*，1990

撰 稿 人：Heddy Zola

单元 5.10 用流式细胞仪检测细胞因子的分泌和分离分泌细胞因子的细胞

注意：除特殊要求，全部培养应在 37℃，5%～7%CO_2培养箱中进行。

基本方案 细胞因子分泌实验

图 5.10.1 是本方法的示意图。本方案是检测体外活化的抗原特异性 T 细胞产生细胞因子的方法。如果在体外用其他刺激物或刺激细胞（如用 LPS 刺激单核细胞），或体内刺激的细胞直接在体外分析，从用捕获试剂标记刺激细胞（步骤 6）开始。

材料（带√项目见附录 1）

冰冷的或 37℃预温的培养液。例如，培养人细胞用含 10% 人 AB 血浆或自身血清的 1640 完全培养液。培养小鼠细胞用含 10% 小鼠血清的 RPM I-1640 完全培养基

抗原，1～10μg/ml 肽或 1～100μg/ml 蛋白质

合适的对照抗原

金黄色葡萄球菌肠毒素（SEB，Sigma）

√PBS，pH7.2，含 0.5%（*m/V*）BSA 和 2mmol/L EDTA，冰上预冷

细胞因子捕获试剂：一抗，包含抗细胞表面抗原的抗体（如 CD45）和抗细胞因子抗体（Miltenyi Biotec 公司）

重组的细胞因子

细胞因子检测抗体（Miltenyi Biotec 公司）：PE、APC（allophycocyanin）或 FITC 标记的抗细胞因子单抗

荧光素标记的抗体：抗人或小鼠 CD4-FITC，抗人 CD14-PerCP，抗小鼠 CD45R/B220- PerCP 等

抗 PE 磁珠（Miltenyi Biotec 公司）

96 孔或 24 孔培养板或 6cm 培养皿

细胞刮或类似工具

1.5～15ml V 形底管或深孔培养板

慢速旋转培养器

1. 制备人 PBMC（单元 8.1）或小鼠脾脏/淋巴结细胞（单元 2.1）。计数细胞和测定细胞活性（附录 3A 和 3C）。

   在细胞分离、刺激和冻存时不要使用任何非人（人细胞）或非小鼠（小鼠细胞）

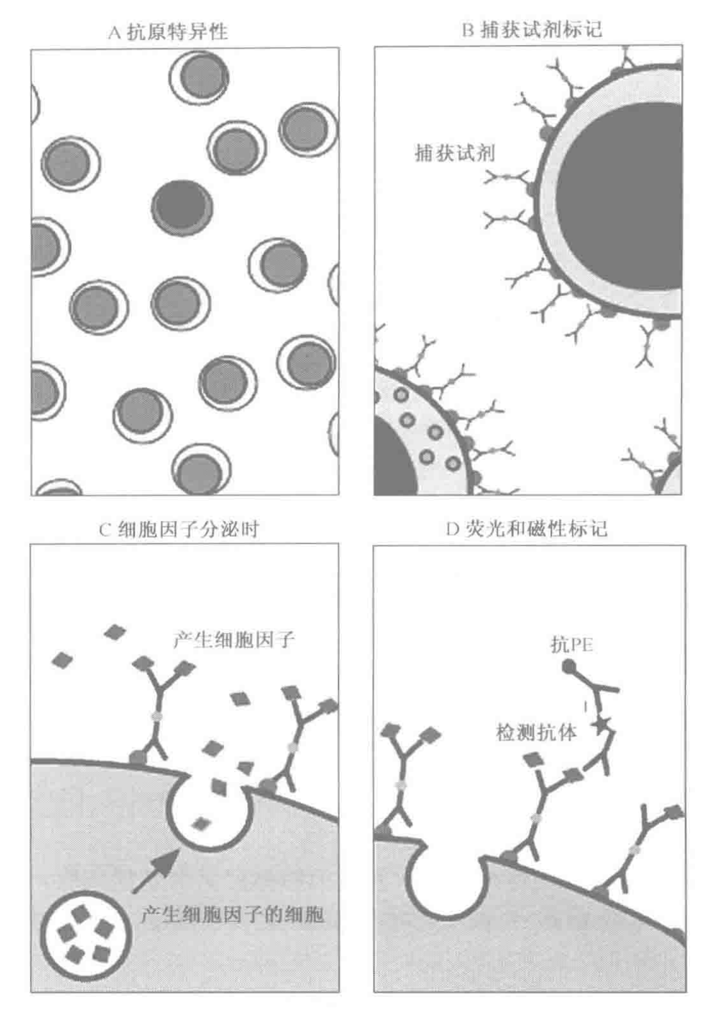


图 5.10.1　细胞因子分泌实验示意图。用捕获试剂（抗细胞表面分子单抗和抗细胞因子单抗的结合物）将细胞因子捕获在细胞表面，再用标记的特异性抗细胞因子抗体检测捕获的细胞因子。免疫磁分选大大增加了检测的敏感性，同时可以分离产生细胞因子的细胞。

的蛋白质，如 BSA 或 FBS。

2. 每 1×10^7 个细胞用 1～10ml 培养液洗涤细胞，4℃，300g 离心 10min。
3. 用培养液悬浮细胞：1×10^7 个细胞/ml 和 5×10^6 个细胞/cm^2（例如 96 孔培养板：1×10^6 个细胞/100μl；24 孔培养板：1×10^7 个细胞/ml；6cm 培养皿：1×10^8 个细胞/10ml）。立即进行下一步，或直接将悬浮细胞置 37℃，5%～7% CO_2 培养箱，培养过夜。
4. 加入抗原（1～10μg/ml 肽或 1～100μg/ml 蛋白质），彻底混匀。孵育 3～6h（肽）或 6～16h（蛋白质）。应设置无抗原或无关抗原的对照。如有需要，可设用 1μg/ml 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 处理的阳性对照，孵育 3～16h。

如果用感染组织来源的抗原，设置一个来源于未感染组织的对照。如果在抗原

样品中加了协同刺激因素（如 1μg/ml 抗 CD28 抗体），必须设置相应刺激对照。

由于细胞因子仅在刺激后短暂分泌，所以刺激后分析的最佳时间点应通过预实验确定。

5. 用细胞刮或类似工具小心收集细胞。
6. 根据细胞数量，加 1×10^5～1×10^7 个细胞到 1.5～15ml V 形底管或深孔培养板。
7. 加入 10 倍量冰冷的含 0.5%（*m*/*V*）BSA 和 2mmol/L EDTA 的 PBS。4℃，300*g* 离心 10min。彻底去除上清液。如果洗液不足 10 倍或上清液不易一次全去除使得洗涤不完全，可重复洗涤。
8. 用 100μl 细胞因子捕获试剂悬浮细胞，细胞因子捕获试剂用冰冷的培养液稀释到适当浓度，常用 10～20μg/ml。彻底混匀。冰中孵育 5min。
9. 可选操作：制备“高对照”，吸取少量细胞悬液，加入适量重组细胞因子，终浓度 200～1000ng/ml。彻底混匀。冰中孵育 10min。执行步骤 12。
10. 根据预期的细胞因子分泌细胞在全部细胞中所占的百分数，用 37℃预温的培养液将细胞稀释到适当浓度：

<1%～5%	1×10^6～2×10^6 个细胞/ml
>1%～5%	1×10^5～2×10^5 个细胞/ml
>20%～50%	<1×10^5 个细胞/ml

11. 拧紧试管，置 37℃ 孵育 30～45min，此期间细胞分泌细胞因子。每 5～10min 混匀细胞一次或用慢速旋转培养器。
12. 加入≥1 倍体积、冰冷的含 0.5%（*m*/*V*）BSA 和 2mmol/L EDTA 的 PBS。4℃，300*g* 离心 10min。彻底弃除上清。
13. 用 100μl 细胞因子检测抗体和其他荧光标记的标记试剂悬浮细胞，抗体和试剂均用冰冷的缓冲液稀释到适当浓度，常用终浓度 1～5μg/ml。彻底混匀。冰中孵育 10min。
14. 加入>10 倍量（体积）冰冷的含 0.5%（*m*/*V*）BSA 和 2mmol/L EDTA 的 PBS。4℃，300*g* 离心 10min。彻底去除上清液。如果洗液体积不足 10 倍或上清液不易一次全去除，导致洗涤不完全，可重复洗涤。
15. 可选操作：根据厂家说明书，免疫磁珠法分离细胞。
16. 加入 500μl 冰冷的含 0.5%（*m*/*V*）BSA 和 2mmol/L EDTA 的 PBS，悬浮细胞。4℃ 避光保存直到分析。
17. 流式细胞仪分析（第四章）。用 PI 或 7-AAD 染色区分活细胞和死细胞。在分析前立即加入 0.5μg/ml PI。计数 200 000 个细胞以提高灵敏度。

备选方案 1　PBMC 分泌细胞因子的快速检测

1. 制备和洗涤细胞（见基本方案，步骤 1 和 2）。用培养液悬浮细胞：1×10^7 个细胞/ml。
2. 每个 1.5ml V 形底管或深孔培养板中加入 100μl 含 1×10^6 个细胞的细胞悬液。标记为 A。
3. 按基本方案步骤 4 加入抗原和孵育细胞。

4. 用1ml培养基洗涤细胞，室温，300*g* 离心5min。吸去上清液。
5. 混匀细胞，转移20μl细胞悬液到含200μl培养液的第2管（孔），标记为B。阴性对照不需要B管（孔）。
6. A管和B管（孔）均加入20μl细胞因子捕获试剂（终浓度5～10μg/ml），混匀。拧紧试管，37℃孵育30min。每5～10min混匀细胞一次或用慢速旋转培养器。
7. 每管（孔）均加入20μl细胞因子检测抗体和其他荧光标记的染色试剂，常用终浓度1～5μg/ml。彻底混匀。室温孵育10min。
8. 加入1ml冰冷的含0.5%（*m*/*V*）BSA和2mmol/L EDTA的PBS。室温，300*g* 离心5min。去除上清液。
9. 加入500μl冰冷的含0.5%（*m*/*V*）BSA和2mmol/L EDTA的PBS，悬浮细胞。流式细胞仪分析（第四章）。用PI或7-AAD染色区分活细胞和死细胞。

备选方案2　全血细胞分泌细胞因子的快速检测

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录1）

肝素化全血

√1×溶解液，新鲜配制

1. 每个1.5ml V形底管或深孔培养板中加入300μl肝素化全血。标记为A。

   抗凝不要用EDTA或枸橼酸/葡聚糖。
2. 按基本方案步骤4加入抗原和孵育细胞。
3. 混匀细胞，转移30μl细胞悬液到含250μl培养液的第2管（孔），标记为B。阴性对照不需要B管（孔）。
4. A管和B管（孔）均加入20μl细胞因子捕获试剂（终浓度5～10μg/ml），混匀。37℃孵育30min。每5～10min混匀细胞一次或用慢速旋转培养器。
5. 每管（孔）均加入20μl细胞因子检测抗体和其他荧光标记的染色试剂，常用终浓度1～5μg/ml。彻底混匀。室温孵育10min。
6. 加入1ml 1×溶解液，轻轻混匀。室温暗处孵育10min。立即混匀。

   注意：不要用流式细胞仪生产商提供的细胞裂解液。
7. 室温，300*g* 离心5min。去除上清液。
8. 加入1ml冰冷的含0.5%（*m*/*V*）BSA和2mmol/L EDTA的PBS，悬浮细胞。室温，300*g* 离心5min。去除上清液。
9. 加入500μl冰冷的含0.5%（*m*/*V*）BSA和2mmol/L EDTA的PBS，悬浮细胞。流式细胞仪分析（见第四章）。

参考文献：Brosterhus *et al.*，1999

撰 稿 人：Mario Assenmacher，Max Lohning and Andreas Radbruch

单元 5.11　ELISPOT 方法检测分泌细胞因子的细胞

基本方案

酶联免疫斑点实验（ELISPOT）的原理是分泌某些蛋白质分子（如细胞因子）的细胞在短时间内能够分泌相对较高浓度的蛋白质分子到周围环境中。如图 5.11.1 所示。

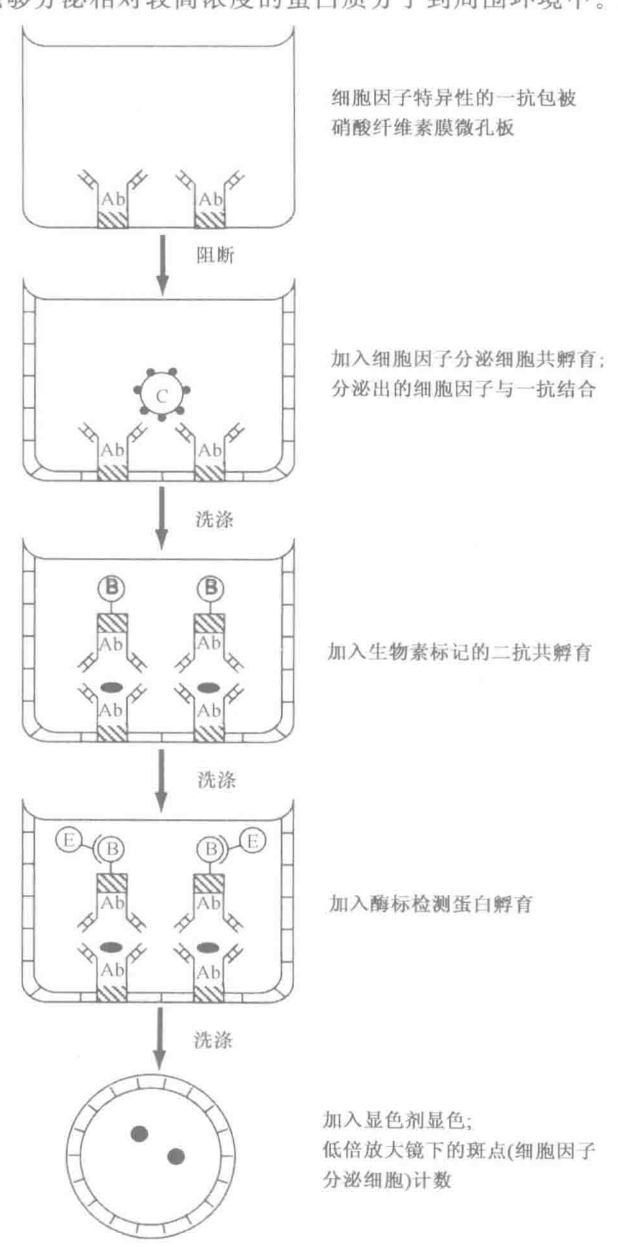


图 5.11.1　ELISPOT 操作流程。简略写：Ab，抗体；B，生物素标记；C，细胞因子分泌细胞；E，酶标检测蛋白。

此检测方法采用两种高亲和力的针对同一种细胞因子不同表位的特异性抗体分子：两种单克隆抗体或是单克隆和多克隆抗血清的混合物。

注意：当操作涉及人血细胞或感染试剂时，必须遵循生物安全规范操作（见前言）。

注：所有用于细胞培养的溶液和仪器都必须是采取相应的灭菌方法予以灭菌。

材料（带√项目见附录1）

细胞因子特异性抗体，纯化级（表5.11.1）

表5.11.1　包被一抗

细胞因子	克隆株	浓度/(μg/ml)[a]	来源[b]
小鼠			
IL-2	JES6-1A12	10	Ph
IL-3	MP2-8F8	10	E
IL-4	BVD4-1D11	5	E
IL-5	TRFK5	5	E
IL-6	MP5-2053	13	Ph
IL-10	JES5-2A5	20	Ph
IFN-γ	RMMG-1	10	B
人			
IL-4	MP4-25D2	10	Ph
IL-5	JES1-39D10	10	Ph
IFN-γ	C1-D16	5	C
IL-10	JES3-9D7	10	Ph
GM-CSF	BVD2-23B6	10	Ph

a. 最终的工作浓度。

b. 供应商：B，Biosource；C，Chromogenix；E，Endogen；Ph，Pharmingen。各供应商地址见附录4。

√包被缓冲液

洗液：含0.25%（V/V）Tween 20的PBS溶液

阻断缓冲液：含5%（m/V）BSA或FCS的PBS溶液

√RPMI-10完全培养基（或其他适宜培养基）

分泌细胞因子的细胞（小鼠或人的）

丝裂原，抗原或其他促细胞因子分泌的刺激物

带有标记物的细胞因子特异性二抗（表5.11.2）

表 5.11.2 二抗

细胞因子	抗体	标记	浓度[a]	来源[b]
小鼠				
IL-2	JES6-5H4	生物素	2μg/ml	Ph
IL-3	MP2-43D11	生物素	0.33μg/ml	E
IL-4	BVD6-24G2	生物素	0.33μg/ml	E
IL-5	TRKF4	生物素	0.25μg/ml	E
IL-6	MP5-32C11	生物素	1μg/ml	Ph
IL-10	SXC-1	生物素	1μg/ml	Ph
IFN-γ	R46A2	生物素	0.125μg/ml	LB
人				
IL-4	兔抗-IL-4[c]	—	10μg/ml	G
IL-5	JES1-5A10	生物素	1μg/ml	Ph
IFN-γ	766	生物素	3μg/ml	C
IL-10	JES3-12G8	生物素	500ng/ml	Ph
GM-CSF	BVD2-21C11	生物素	500ng/ml	Ph

a. 最终的工作浓度。

b. 供应商：C，Chromogenix；E，Endogen；G，Genzyme；LB，Lee Biomolecular；Ph，Pharmingen。各供应商地址见附录 4。

c. 与三抗联合应用，如碱性磷酸酶结合的羊抗兔的 IgG（Fc-特异性，详见附录 1）。

ELISPOT 稀释缓冲液：含 1%（m/V）BSA 的 PBS 溶液

适用于所检测细胞的检测抗体或蛋白

碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AP）或辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）偶联的链亲和素（用于人的检测；Jackson Inmmunoresearch）

AP 偶联的亲和素 D（用于小鼠的检测；Vector）

AP 或 HRP 偶联的羊抗兔 IgG（Fc 特异性；Jackson Inmmunoresearch）

√PBS 溶液

BCIP/NBT 溶液（Kirkegaard&Perry；现用现配）或氨乙基咔唑（aminoethylcarbazole，AEC）溶液（附录 1）

96 孔硝酸纤维素膜微孔板（Millipore）

37℃，5% CO_2 培养箱

解剖显微镜，10×或 30×放大倍数

1. 加入 50μl 含有细胞因子特异性一抗的包被缓冲液至硝酸纤维素膜微孔板的孔中。盖上盖子或塑料封条。常温下孵育 2h 或 4℃孵育过夜。

   最佳抗体浓度应预先设定（表 5.11.1）。根据不同的 ELISPOT 检测选择最佳的包被条件。包被抗体的浓度通常是常规 ELISA 所用浓度的 5～10 倍（如 5～10μg/ml）。抗体通常稀释于碳酸盐缓冲液中（pH9.6）。在一些实验中，也可采用 PBS（pH7.2～7.4）或硼酸盐缓冲液（pH8.4）。

2. 倾倒包被抗体液。用洗液洗涤 3 次［200μl/(次·孔)］。最后一次甩掉剩余的洗液，

并在灭菌的吸水纸上扣干。

3. 每孔加入 200μl 阻断液，37℃孵育 30min。
4. 倾倒阻断液。用洗液洗涤 3 次［200μl/(次·孔)］。最后一次甩掉剩余的洗液，并在灭菌的吸水纸上扣干。
5. 每孔加入 100μl RPMI-10 完全培养基，室温孵育 10min 后倾倒孔中的液体并在灭菌的吸水纸上扣干。
6. 在另外一块微孔板上用 RPMI-10 完全培养基准备 2～4 倍稀释浓度的细胞悬液。向包被板的每孔加入总量≤100μl 的单细胞悬液，起始细胞数为 10^5 个细胞/孔或 10^6 个细胞/孔。每个实验条件设立 3～4 个复孔。如果条件允许，可以设立一个已知的分泌待测细胞因子的细胞系作为阳性对照。

   准备好的细胞尽可能快的铺板。对于外周血细胞，破碎红细胞的步骤是必需的（单元 2.1），而对于小鼠的脾细胞，破红步骤则不是必需的。

7. 向细胞中加入丝裂原，抗体或其他促细胞因子分泌的刺激物。未刺激的细胞（只有培养基）作为背景对照及体内激活的对照。

   有关刺激细胞的操作见单元 2.11、2.12、8.8 及 8.15。

   为防止细胞因子的再分泌（相对于原有的已分泌的细胞因子），可以设置加入蛋白抑制剂如环磷酰胺（100μg/ml）的对照。环磷酰胺应加入 3～4 个复孔，而且刺激和未刺激的细胞组都要有此对照，并于孵育的初始加入。

8. 将细胞于 37℃，5%CO_2 培养箱中水平放置培养 6～24h。

   最佳的培养时间应根据待测细胞因子及刺激物而定。如果培养时间过短，则最终的斑点数会有所减少。而如果培养的时间过长，则背景会随之升高。

9. 每孔用 200μl 洗液充分地洗涤 10 遍从而完全地移除细胞。如需要，最后一遍采用双蒸水洗涤裂解残存的细胞。最后甩掉剩余的洗液，并在灭菌的吸水纸上扣干。
10. 每孔加入 50μl 含标记的细胞因子特异性二抗的 ELISPOT 稀释缓冲液。室温孵育 2h。

    适合的抗体浓度应预先设定（表 5.11.2）。

11. 倾倒二抗缓冲液。用洗液洗涤 6 次［200μl/(次·孔)］。甩掉剩余的洗液，并在灭菌的吸水纸上扣干。
12. 每孔加入 50μl AP 或 HRP 偶联的检测抗体或蛋白质（如亲和素、链亲和素或羊抗兔 IgG）后室温孵育 2h。

    适合的抗体浓度应预先设定。

13. 用洗液洗涤 6 次［200μl/(次·孔)］并拍干。用 PBS 洗涤 1 次并拍干。
14. 每孔加入 50μl BCIP/NBT 溶液（对于 AP）或 50μl AEC 溶液（对于 HRP），室温孵育 5～30min 直至蓝色斑点（AP）或褐色斑点（HRP）形成。

    每个阳性对照孔都应有斑点形成（100%效率）。

15. 每孔用 200μl 双蒸水洗涤 3 遍并风干。用 10×或 30×放大倍数的解剖显微镜计数斑点。如需要，可采用成像技术或简单的相片对每个孔逐一进行分析。

参考文献：Czerkinsky *et al.*，1991

撰 稿 人：Dennis M. Klinman and Thomas B. Nutman

单元 5.12 α-、β-和 γ-干扰素诱导的抗病毒活性的检测

注意： VSV 是具潜在危险性的病原体。所有的操作人员必须在规范的操作条件下处理 VSV（见前言）。所有 VSV 感染的实验材料（如枪头和稀释管）必须放置于生物安全袋中并自动封口。感染的上清必须直接吸入至含有漂白剂的长颈瓶中。细胞一旦经过甲醛固定，就不会有从培养皿中感染的可能性。

注： 所有与细胞相关的溶液和仪器都必须采取相应的灭菌方法予以灭菌。

基本方案　小鼠干扰素诱导的抗病毒活性的检测

实验所用的细胞是小鼠的 L929 成纤维细胞，这种细胞具有对干扰素和 VSV 的高敏感性。细胞应当来源于已经建立此项检测的实验室而非商业化的途径。持续而稳定的细胞传代有益于检测结果的可信度。但是以每周一次传代的频率持续 4～6 个月的传代后，达到 100％CPE 的时间会延长而且终点会变得较为模糊。当有此种现象发生时，应更换新的细胞株。

材料（带√项目见附录 1）

干扰素敏感的 L929 成纤维细胞
√EMEM 培养基（Eagle 氏最低要求培养基）
√胰酶消化液
检测样品（具干扰素活性的血清或培养上清）
小鼠干扰素的参照标准品 α-干扰素、β-干扰素、γ-干扰素以及 αβ-干扰素（从美国马里兰州贝塞斯达国家过敏与感染疾病研究院 Laughlin 博士处获得）
水疱性口炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV；印第安纳株）
4℃的 EBSS（Earles 平衡盐溶液）
5％（*V*/*V*）福尔马林
含 0.05％（*m*/*V*）结晶紫的 20％乙醇
100％甲醇（可选）
75cm² 的直颈组织培养瓶（Falcon 或 Costar）
8 通道微量移液器（固定或调整至 50μl 和 100μl；Costar）
96 孔平底微孔板（Falcon 或 Costar）
8 孔吸液器（Drummond；Thomas Scientific）
倒置显微镜
定轨摇床（可选）
微量滴定板读板仪（酶联仪）（可选）

1. 将约 1×10^6 干扰素敏感的 L929 成纤维细胞悬于 25ml EMEM 培养基中，接种至 75cm² 组织培养瓶。在 37℃，6％CO_2 培养箱中培养约 1 周（或直至铺满培养瓶）。
2. 向铺满细胞的培养瓶内加入 3ml 胰酶消化液，待细胞从培养瓶底脱离下来后收集获

取 L929 单细胞悬液。并用 EMEM 培养基以 2×10^6 个细胞/ml 的浓度重悬细胞。

3. 用 8 通道微量移液器向 96 孔平底微孔板加入 50μl /孔的 EMEM 培养基。每加一行检测样品就同时设置一行参照标准品。
4. 加入 50μl 1 号样品至 A 行的第 3 孔。依此类推将 2～7 号样品分别加入 B～G 行的第 3 孔。H 行的第 3 孔加入 50μl 含 100U/ml 小鼠干扰素参照标准品的 EMEM 培养基。
5. 倍比稀释干扰素样品，温和混匀第 3 孔中内容物并吸取 50μl 至第 4 孔。依此类推直至第 12 孔，并从第 12 孔中弃去 50μl。
6. 向每孔加入 50μl L929 成纤维细胞。用手温和旋转培养板以使细胞均匀分散。在 37℃，6%CO_2 培养箱中孵育过夜。
7. 用 EMEM 培养基稀释 VSV 至适宜浓度（见辅助方案 1）。用 8 孔吸液器吸出每孔中的上清，吸取时将培养板倾斜一定的角度以防板底的细胞被吸液器的吸头破坏。
8. 从第 2 列开始，向每孔加入 100μl 病毒至最终 MOI 值为 0.1（MOI：病毒对细胞的感染比率）。向第 1 列的每孔中加入 100μl 的 EMEM 培养基。37℃，6%CO_2 培养箱中孵育 24h。
9. 在倒置显微镜下观察单层细胞。在未感染的对照孔（第 1 列）中单层细胞是规整的，而病毒感染的阳性对照孔（第 2 列；无 IFN）中细胞被完全破坏（即 100%细胞病变效应或 CPE）。
10. 用 8 孔吸液器吸出每孔中的上清。用 100μl 预冷的 EBSS 液洗涤。剧烈的摇动培养板（或置于定轨摇床上振荡 15s）使细胞碎片脱落。重复 2 次。
11. 弃去最后一次洗液并加入 100μl/孔 5%福尔马林。室温放置 10min。在有水流的情况下将板中的福尔马林摇至水池中。
12. 每孔加入 100μl 结晶紫溶液。室温放置 10min。用流水冲洗培养板，并在吸水纸上扣干。

13a. 观察培养板的情况并进行评价（可以用较少的时间得到一般的精确度）：将各样品稀释浓度中第一个出现等同于病毒阳性对照孔（第 2 列，应当约为 100%CPE）CPE 的孔定义为终点。将滴度倒数（U/ml 表示）与参照标准品的终点进行比较。

例如，如果干扰素参照标准品的终点是第 9 孔并且终浓度为 100U/ml，样品的终点是第 10 孔，则待测样品的抗病毒活性为标准品的 2 倍，即 200U/ml。

将 50%CPE 的孔作为终点可以提高检测的灵敏度，但是如何从肉眼观察的角度上定义 50%CPE 较为困难。

13b. 采用分光光度法测定样品（较精确）：每孔加入 100μl 100%甲醇并轻轻搅动以洗去细胞上的染料。立即用读板仪在 595nm 波长处检测每孔的吸光度（甲醇的蒸发会导致度数的不精确性）。将病毒对照孔（第 2 列）作为分光光度法的本底对照。将未感染细胞（第 1 列）的平均 595nm 的吸光度作为 0% CPE。将产生 50%CPE 的孔定义为终点（即吸光度约为未感染细胞对照孔的 1/2）。对于每个样品，比较其终点与参照标准品的终点，如上所述。

辅助方案1 病毒培养体系的建立

附加材料（其他材料见基本方案）

Vero细胞（ATCC#CCL 81）
$150cm^2$的组织培养瓶
水平滚瓶器

1. 37℃，6%CO_2培养箱中EMEM培养基培养Vero细胞直至铺满$150cm^2$的组织培养瓶（约2.5×10^7个细胞/瓶）。
2. 2.5×10^5PFU（蚀斑形成单位，Plaque Forming Unit，PFU）的VSV加入至3ml的EMEM培养基里感染单层细胞。在培养箱中的滚瓶器上孵育45min使病毒进入至细胞中。
3. 加入12ml EMEM培养基培养24h。当细胞<50%汇合生长时（即>50%CPE）收集上清，在台式离心机中以50g的转速离心10min除去细胞碎片。
4. 收集富含病毒的上清并放置于冰上。在冰上0.5～1.0ml等分。储存于−70℃（不能储存于−20℃）。
5. 采用蚀斑法测定所储存病毒株的滴度（Vogel and Fertsch，1987）。测定VSV病毒株的PFU/ml值。
6. 确定在抗病毒检测中所使用的浓度。计算0.1 MOI（病毒颗粒与细胞为1∶10）时，感染96孔微孔板中2×10^5个细胞/孔的单层L929细胞所需的病毒液浓度。

   L929细胞铺满微孔板的数量大约是2×10^5个细胞/孔。如果VSV病毒液的浓度是1×10^9PFU/ml，用EMEM培养基1∶5000稀释病毒液2×10^5PFU/ml，感染细胞时每孔加100μl（总量2×10^4PFU）。
7. 为了优化抗病毒检测的条件，使用上述稀释度以及其2倍或1/2的稀释度进行检测。应该在24h内观察到完全的CPE。

辅助方案2 抗体中和实验

抗体介导的干扰素诱导的抗病毒活性的逆转可以用来区分样品中发挥抗病毒活性的干扰素的种类，或者用来检测特定种类干扰素的特定的抗体制品。

1. 用EMEM培养基将待检测抗体进行2倍系列倍比稀释，终体积为100μl/孔。
2. 基本方案中所测定的相应干扰素样品的浓度调整为20U/ml。每孔加入50μl。

   此实验中必须测定干扰素的浓度[在对照抗体和（或）EMEM存在情况下]，以确定其对VSV感染的细胞的100%的保护效应。而且，也应设立病毒对照孔，以确定可发生100%的CPE。
3. 每孔加入50μl L929成纤维细胞悬混液（干扰素终浓度5U/ml）。用手轻轻悬转培养板使细胞均匀分散。37℃，6%CO_2培养箱中培养24h。
4. 吸出孔中液体，感染VSV（见基本方案，步骤9）。
5. 感染约24h后，显微镜下观察病毒对照孔，收集，洗涤，固定并染色细胞（见基本方案，步骤10～11）。分光光度计读板（步骤13b）。

6. 测定抗体制品的中和滴度，即中和掉50%的5U/ml干扰素活性的抗体的最高稀释度的倒数。
7. 可选操作：抗体的中和活性以U/ml表示。效价乘以5（调整为中和5U/ml），再乘以4（调整为相对于加入的样品和细胞4倍稀释度的抗体），然后再乘以5（因为检测的体积为0.2ml）。

备选方案 人干扰素诱导的抗病毒活性的检测

人的α-、β-和γ-干扰素的检测与小鼠的干扰素的检测步骤除了以下所列其余均相同。

附加材料

脑心肌炎病毒（encephalomyocarditis virus，EMCV）（ATCC＃VR129B）

人干扰素参照标准品（从美国马里兰州贝塞斯达国立过敏与感染疾病研究院Laughlin博士处获得）

人二倍体成纤维细胞（FS-4；Havell，Vilcek，1972）人21三体细胞系（GM2504；Preble *et al.*，1982），或人肺癌细胞系（A549；ATCC＃CCL185）

1. 在L929成纤维细胞中培植高滴度EMC株，采用0.1MOI（见辅助方案1）。
2. 用EMC病毒检测人细胞（见基本方案，步骤8～15）。检测α-和β-干扰素时采用人二倍体成纤维细胞，如FS-4，或者为达到极高的灵敏度采用人21三体细胞系，如GM2504。检测γ-干扰素采用人肺癌细胞系。

参考文献：Rubenstein *et al.*，1981；Vogel *et al.*，1986；Yeh *et al.*，1982

撰 稿 人：Stefanie N. Vogel，Robert M. Friedman，and M. Michele Hogan

单元5.13 趋化因子超家族的生物学反应

关于趋化因子超家族的详细的摘要列在表5.13.1和表5.13.2中，包括别名、受体-配体对、受体细胞分布、白细胞反应性。

注意：当操作涉及人血细胞或感染试剂，必须遵循生物安全规范操作（见前言）。

注：所有应用于这些实验的介质都应保存于室温。

基本方案1 微型趋化实验检测趋化因子对粒细胞的趋化

此实验可用于检测中性粒细胞，嗜曙红细胞或嗜碱性粒细胞对于趋化因子的反应性。重要的是要获得高纯度的无明显活化或调节的细胞群。

材料

趋化培养基：含2nmol/L谷氨酰胺，25nmol/L HEPES，和1%（*m/V*）BSA（Fraction V；Sigma）的RPMI 1640培养基

表 5.13.1　CC 型趋化因子、受体及靶细胞

CC(β)型趋化因子[a]	受体	靶细胞
C10(MRP-1)		
CCF18		T(CD4⁺)
DC-CK1(AMAC-1,MIP-4,PARC)		T(CD45RA⁺)
ELC(Ck-β-8,MIP-3β,MPIF-1)	CCR1,7	T,B
Eotaxin	CCR3	Eo
Eotaxin-2(Ck-β-6,MPIF-2)	CCRS	T,Eo,Ba
Exodus-1(LARC,MIP-3α)	CCR6	
HC-21		
HCCC-1(HCC-3,NCC-2)	CCR1	Mo,CD34⁺
HCC-2(NCC-3,MIP-5,MRP-2)		Mo,Eo
HCC-4(NCC-1,NCC-4,LEC,LMC,LCC-1,monotactin 1)		Mo
I-309(I-309,TCA-3)	CCR8	Mo
ILINCK		
Lkn-1	CCR1,3	T,Mo,N
MCP-1(GDCF,HC-11,JE,LDCF,MCAF,SMC-CF,TDCF)	CCR2A,2B,4,10	T,Mo,SMC,NK,DC,Ba
MCP-2(HC-14,NC28)	CCR1,2B,3,5,	T,Mo,NK,EC,Eo,DC,Ba
MCP-3(FIC,P16)	CCR1,2B,3,10	T,Mo,N,NK,Eo,DC,Ba
MCP-4	CCR2B,3,10	T,Mo,Eo,Ba
MCP-5	CCR2	Mo,Eo
MDC(STCP-1)	CCR4	T,Mo,N,NK,DC
MIP-1α(EP,L2G25B,SCI,SIS-α,TY5)	CCR1,2B,3,4,5	T,Mo,NK,DC,Eo,CHAK,N
MIP-1β(ACT-2,G26,H400,LAG-1)	CCR3,5,8	T,Mo,NK,DC,Eo,CHAK
MIP-1γ		
MIP-1δ	CCR1	
MIP-5	CCR1,3	T,Mo,Eo
RANTES(EoCP-1)	CCR1,3,4,5	T,Mo,NK,DC,Eo,Ba
SCYA26		T,Mo
SLC(6CKine,Exodus-2,TCA-4)	CCR7	T
TARC	CCR4,8	T
TECK	CCR9	Mo,DC

a. 缩略词:ACT-2,活化基因子-2;AMAC,可选择的巨噬细胞相关的 CC 型趋化因子;Ck-β,β 型趋化因子;EoCP,嗜酸性粒细胞趋化蛋白;ELC,EB 病毒诱导的基因 1 配体趋化因子;FIC,成纤维细胞诱导的细胞因子;GDCF,胶质瘤诱导的趋化因子;HCC,血透 CC 型趋化因子;ILINCK,IL-10 可诱导的趋化因子;LAG,淋巴细胞活化基因;LARC,肝脏及活化相关趋化因子;LDCF,淋巴细胞来源的趋化因子;LEC,肝脏表达的趋化因子;Lkn,白血病趋化因子;LCC,肝脏的 CC 型趋化因子;LMC,淋巴细胞和单核细胞趋化剂;MRP,MIP 相关蛋白;MCAF,巨噬细胞趋化活化因子;MCP,巨噬细胞趋化蛋白;MDC,巨噬细胞来源的趋化因子;MIP,巨噬细胞炎性蛋白;NCC,新型 CC 型趋化因子;PARC,肺脏及活化相关趋化因子;SLC,干细胞抑制剂;SMC-CF,平滑肌细胞来源的趋化因子;STCP,激活的 T 细胞趋化蛋白;TARC,T 细胞及活化相关趋化因子;TCA,T 细胞活化蛋白;TDCF,肿瘤来源的趋化因子;TECK,胸腺表达的趋化因子。

表 5.13.2　CXC 型、C 型、CXXXC 型趋化因子，受体及靶细胞

趋化因子[a]	受体	靶细胞
ELR- containing CXC(α) chemokines		
ENA-78(NAP-2)	CXCR1,2	N,EC
GCP-2(CKA-3)	CXCR1,2	N,EC
GROα(GRO-1,MGSA,NAP-3)	CXCR1,2	T,N,Mo,EC,F
GROβ(GRO-2,MGSA,MIP-2α)	CXCR1,2	T,N,Mo,EC,F
GROγ(GRO-3,MGSA,MIP-2β)	CXCR1,2	T,N,Mo,EC,F
IL-8(3-10C, AIF, ANAP, chemotaxin, EDNAP, FDNAP, FINAP, GCF, GCP-1, LCF, LDNAP, LIF, LUCT, LYNAP, MDNAP, MDNCF, MOC, MONAP, NAF, NAP-1, NCF, NCP, TCF)	CXCR1,2	N,T,Mo,NK,B
Non-ELR-containing CXC(α) chemokines		
BLC(BCA-1,blr-1 ligand)	CXCR5	B
BRAK		
FDNCF		N
IP-10(C7,IP-10)	CXCR3	T,Mo,NK,EC
I-TAC(H174,IP-9)	CXCR3	T
KC(N51)	CXCR2	N
LIX		
Lungkine		N
MIG(HUMIG,M119)	CXCR3	T,Mo
MAP-4		N
PF-4(CTAP-3,oncostatin A)		Mo,N
SDF-1α(IRH,PBSF,TLSFα)	CXCR4	T,Mo,CD34+
SDF-1β(IRH,PBSF,TLSFβ)	CXCR4	T,Mo,CD34+
β-TG(PPBP)		N,F
C(γ) chemokines		
ATAC		T
Ltn		T,NK,DC
SCM-1α	XCR1	
SCM-1β	XCR1	
CXXXC(δ) chemokines		
Fractalkine(neurotactin)	CX3CR1	T,Mo,N

a. 缩略词：AIF，凋亡诱导因子；ANAP，带负电荷的中性粒细胞活化肽；ATAC，活化诱导的 T 细胞来源的以及趋化因子相关的；BCA，B 细胞趋化的；BLC，B 淋巴细胞趋化的；blr，Burkitt 氏淋巴瘤受体；BRAK，乳腺及肾脏细胞趋化因子；CKA，α 型趋化因子；CTAP，结缔组织活化肽；EDNAP，内皮细胞来源的中性粒细胞活化肽；ENA，内皮细胞来源的中性粒细胞活化因子；FDNAP，成纤维细胞来源的中性粒细胞趋化蛋白；GCF，粒细胞趋化因子；GCP，粒细胞趋化肽；GRO，生长肽；HUMIG，γ 干扰素诱导的人单核因子；IP，干扰素可诱导蛋白；IRH，肝细胞瘤的内分泌降低；I-TAC，干扰素可诱导的 T 细胞 α 型趋化；KC，角化细胞来源的趋化因子；LCF，淋巴细胞趋化因子；LDNAP，淋巴细胞来源的中性粒细胞活化肽；LIF，白血病抑制因子；LIX，脂多糖诱导的 CXC 型趋化因子；Ltn，淋巴毒素；LUCT，肺癌来源的趋化毒素；LYNAP，淋巴细胞来源的中性粒细胞活化肽；MDNAP，单核细胞来源的中性粒细胞活化蛋白；MDNCF，单核细胞来源的中性粒细胞趋化因子；MGSA，黑色素瘤生长刺激活性；MIG，γ 干扰素诱导的单核因子；MIP，巨噬细胞炎性蛋白；MONAP，单核细胞来源的中性粒细胞活化肽；NAF，中性粒细胞活化因子；NAP，中性粒细胞活化肽，中性粒细胞趋化蛋白；NCF，中性粒细胞趋化因子；NCP，中性粒细胞趋化蛋白；PBSF，前 B 细胞生长刺激因子；PF，血小板因子；PPBP，血小板基础蛋白；SCM，单个半胱氨酸基序-1；SDF，基质细胞分化因子；TCF，T 细胞因子；β-TG，β 血小板球蛋白(凝血球蛋白)；TLSF，胸腺瘤细胞刺激因子。

重组的人或啮齿目的趋化因子（如 R&D System、Pepro Tech、PharMingen、Biosource 公司产品）

含 1mmol/L 甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸（formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine，fMLP；Sigma）的趋化培养基

1μg/ml CC 型趋化因子 RANTES（趋化性的阴性对照；表 5.13.1 和表 5.13.2）

Diff-Quik 染液（Baxer）

多孔的微型趋化小室以及附带的夹子和细胞刮（Neuro Probe）

3～5μm 孔径的聚碳酸酯膜（Neuro Probe），不含聚乙烯基吡咯烷酮（PVP-free）

Zeiss Axioskop 显微镜（型号：D-7082），40×物镜和 100×油镜

数码相机（如 Ikegami Electronics）

图像分析仪（V 型，Optomax）

1. 密度梯度离心法结合葡聚糖沉淀法制备纯化的中性粒细胞（见 CPI 单元 7.23）。用趋化培养基调整细胞浓度至 1×10^6～1.5×10^6 个细胞/ml。

   制备纯化的嗜曙红细胞采用葡聚糖沉淀法结合不连续的 Percoll 密度梯度离心以及抗体介导的阴性选择法（见 CPI 单元 7.31）。制备纯化的嗜碱性粒细胞采用不连续的 Percoll 密度梯度离心以及抗体介导的阴性选择法（见 CPI 单元 7.24）

2. 用趋化培养基制备一系列稀释浓度的趋化因子。推荐在 25～100ng/ml 的范围内选择 3～4 个稀释度。

3. 每个趋化因子浓度在多孔微型趋化小室都设三个复孔，每孔加入 26～28μl（图 5.13.1）。并包含三个对照孔：趋化培养基（背景对照），0.1μmol/L 的 fMLP（趋化阳性对照；来自于 1mmol/L fMLP 的储存液），25～50ng/ml 的对中性粒细胞无趋化作用的 CC 型趋化因子（RANTES）（阴性对照；来自于 10μg/ml 的 RANTES 储存液）。

   已知诱导中性粒细胞趋化的趋化因子参见表 5.13.1 和表 5.13.2。

   在各孔中后续加入体积取决于多孔微型趋化小室的容积。后续加入时要格外小心，因为液体加少了很容易产生气泡（干扰中性粒细胞的滤过迁移），而液体加多了会导致交叉感染。加入后的液面应该刚好沿孔缘呈球状面凸起。

   通常用棋盘分析法来评定某种试剂的趋化活性或化学激动活性。采用滴定法滴定多孔微型趋化小室的顶部及底部孔中倍比稀释浓度的化学趋化剂来检测。化学趋化剂引起的迁移反应随着在趋化小室上部的孔中添加等量的趋化物而减弱。然而，在上部添加少量的趋化试剂对反应相对没有明显的影响，而在下部添加少量试剂时影响相对较大。

4. 在不含 PVP 的聚碳酸酯膜（滤纸）的边角做一切痕。将这个滤纸用镊子覆盖在底层趋化小室的孔上，并使得切痕位于左上角。调整滤纸的部位使得其能覆盖周边的孔，但要避免调整过度以防止交叉污染。

5. 用附带的垫片压住滤纸。通过下压垫片朝上的一面迅速安装好小室，在垫片的中间和四周均匀用力以防止交叉污染和气泡的生成。确保拧紧金属螺帽。

6. 吸取 50μl 中性粒细胞悬液（5×10^4～7.5×10^4 个细胞）至装置上部顶盖的孔中。将枪头抵在孔壁的上部小心的将液体排出，防止气泡产生。

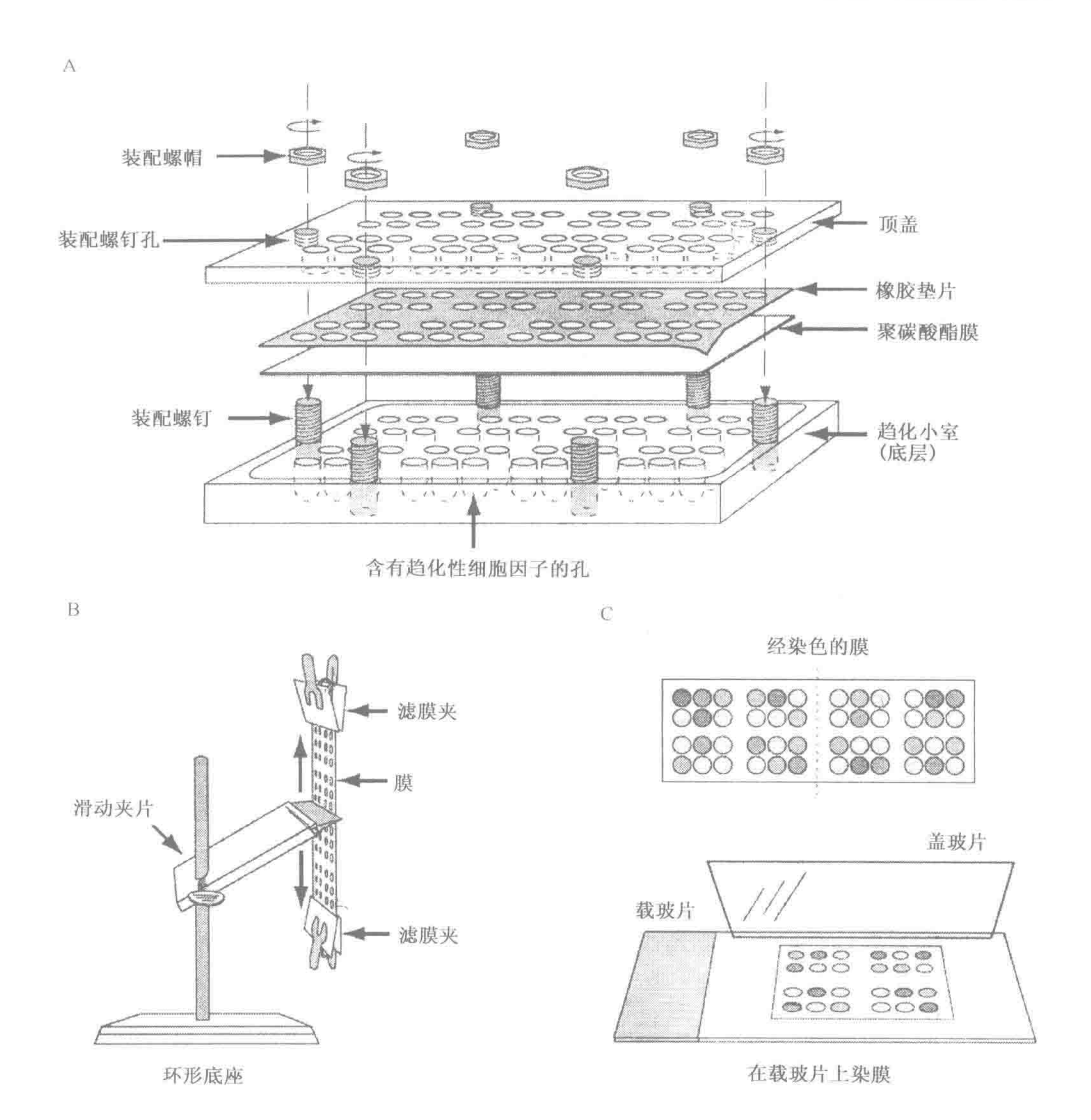


图 5.13.1　多孔的微型趋化小室装置及趋化膜的处理。A. 小室的底部为一个 48 孔 U 形培养板，每孔容量约为 25μl。培养板上方为一层聚碳酸酯膜，膜上方的橡胶垫片有相应的 48 个孔。小室最上方的顶盖也有相应的 48 孔，整个装置由 6 个螺钉固定在一起。细胞上清加入至装置上方由膜和顶盖所组成的孔中。B. 小室拆装后，将夹子固定在膜的两端，将面向小室一侧的膜轻柔地划过已固定的细胞刮从而去除黏附的未迁移的细胞。C. Diff-Quik 染色后的膜一分为二，分别放置于载玻片上，加入油浸润后覆盖盖玻片。

7. 在 37℃，5% CO_2 的培养箱中培养 30min。
8. 将趋化小室从培养箱中取出，倒置小室，去掉固定螺母，并弃去趋化小室的底层 48 孔 U 形板。此时切痕的位置应该在小室的右上角。
9. 去掉未迁移的细胞（如那些吸附在滤纸上而没有迁入滤纸的细胞），用一个细胞刮轻轻地刮去滤纸面上（初始向上的一面）的“细胞”（图 5.13.1）。用小室上附带的夹子固定住滤纸的两端。重复地刮 5 遍后在空气中干燥滤纸 15min。

10. 固定滤纸，按照生产商的说明书用 Diff-Quik 染液将滤纸染色。用过量的水清洗后在空气中干燥。
11. 经油浸润的滤纸的细胞面向下固定在载玻片上并盖上盖玻片，标记趋化小室各孔的位置。给样品编号后交送负责计数的实验人员。
12. 计算中性粒细胞的数目，每孔至少随机计数 5 个区域，并用 40× 物镜或 100× 油镜观察。避免将没有从滤纸上除去的黏附的细胞计算在内；在光镜下它们能够与迁移细胞区分出来。如需要，可以用影像分析器计数。

    迁移的淋巴细胞可能从滤纸上脱落至趋化小室的底部孔中。这些细胞也应该计算在结果之内，以防滤纸上的结果偏小。

    迁移细胞之间容易聚集，形成葡萄簇状，从而经常被当成一个细胞计数，从而导致结果偏低（除非能精确的数出此簇中细胞的数目）。
13. 按下面方法描述结果：
    a. 计算随机的 5 个或 5 个以上密集区域的迁移细胞的平均数目（+/－SD），并检测 3 遍（如计算 15 个总的计数区域的平均值）。
    b. 趋化指数（CI）＝待测趋化剂迁移细胞的数目/背景对照中的迁移细胞的数目。

    可以用多种统计方法对这些检测结果做统计分析，包括双尾的 student t 检验或 Kruskal-Wallis 的非参 ANOVA 来检验三份平均数据。两个条件下迁移具显著差异，需要三个复孔中的各 5 个密集区域观察到的细胞数目均有显著的差异（$P<0.05$）。

备选方案 1　微型趋化实验检测趋化因子对单核细胞的趋化

趋化因子对单核细胞的趋化性可以通过 PVP 包被的聚碳酸酯滤纸上的趋化因子梯度检测。树突细胞的迁移也可以用类似的步骤检测。

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

含 10^{-3}mol/L 甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸（formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine，fMLP；Sigma）的趋化培养基或其他阳性对照（表 5.13.1 和表 5.13.2）

10μg/ml 白细胞介素 8（IL-8）或血小板因子 4（PF-4）作阴性对照

√PBS

5μm 孔径的聚乙烯吡咯烷酮（polyvinylpyrrolidone，PVP）包被的聚碳酸酯膜（Neuro Probe）

1. 采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心和淘洗离心法（单元 8.5）分离出人外周血单个核细胞（PBMC）。用趋化培养基调整细胞浓度至 1×10^6～1.5×10^6 个细胞/ml。
2. 采用趋化培养基制备连续浓度梯度的趋化因子稀释液。推荐在 5～50ng/ml 的范围内选择 3 个或 3 个以上的稀释度。
3. 每个趋化因子浓度在多孔微型趋化小室均设三个复孔，每孔加入 26～28μl（图 5.13.1）。并设置三份对照孔：趋化培养基（背景对照），1～100nmol/L fLMP 或其他能诱导单核细胞迁移的趋化因子（阳性对照；来自 1mmol/L 的 fLPM 的储存液），

25～50ng/ml 的 IL-8 或 25～50ng/ml 的 PF-4（阴性对照；来自 10μg/ml 的储存液）。

能诱导单核细胞迁移的趋化因子见表 5.13.1 和表 5.13.2。其余补充注解参考基本方案 1，步骤 3。

4. 在 PVP 包被的聚碳酸酯膜（滤纸）的一角做一划痕。将这个滤纸用镊子覆盖在底层趋化小室的孔中，使得切痕位于左上角。调整滤纸的位置使得它能覆盖周边的孔。但要避免调整过度以防止交叉污染。
5. 用附带的垫片压住滤纸。通过下压垫片朝上的一面迅速安装好小室装置，在垫片的中间和四周均匀用力以防止交叉污染和气泡的生成。确保拧紧金属螺帽。
6. 吸取 50μl PBMC 悬液（5×10^4～7.5×10^4 个细胞）至趋化小室装置上部顶盖的孔中。将枪头抵在孔壁的上部小心的将液体排出，防止气泡产生。
7. 在 37℃，5% CO_2 的培养箱中培养 90min。
8. 移去没有迁移的细胞，固定滤纸并染色，按基本方案 1（步骤 8～13）分析结果。但每孔要选取 3～5 个随机区域计数迁移细胞的数目。

备选方案 2　微型趋化实验检测趋化因子对淋巴细胞的趋化

用细胞外基质蛋白（如纤连蛋白、I 型或 V 型胶原蛋白、层粘连蛋白）预包被滤纸，从而能够在滤纸上形成趋化因子介导的淋巴细胞的迁移。

附加材料（其他材料见基本方案 1）

趋化培养基：含有 0.5%（*V/V*）热灭活的 FBS 的 RPMI 1640 培养基（附录 1）
含 10μg/ml 的 SDF-1α（R&D Systems）的趋化培养基
ECM 包被的滤纸（见辅助方案）

1. 分离 T 细胞，B 细胞或 NK 细胞（单元 8.2～8.4 和 8.6）。用趋化培养基将细胞的浓度调整为 1×10^6～1.5×10^6 个细胞/ml。

    一些研究者利用 T 细胞富集柱（R&D 系统）作为快速获得浓缩的人或小鼠 T 细胞的方法。通常过柱的方法能够产生 85%～94% 的 $CD3^+CD19^-CD16^-$ 淋巴细胞。这群细胞具有趋化自动性，与用尼龙膜、Percoll 密度梯度离心和抗体包被的磁珠做阴性选择所纯化的淋巴细胞相比，这群细胞能高表达趋化因子受体。类似的是，用此种快速富集所方法所收集的 B 细胞和 NK 细胞也能产生更多相应的具有自动趋化性的淋巴细胞群。

2. 采用趋化培养基制备连续浓度梯度的趋化因子稀释液。推荐在 5～50ng/ml 的范围内选择 3 个或 3 个以上的稀释度。
3. 每个趋化因子浓度在趋化小室均设三个复孔，每孔加入 25～28μl（图 5.13.1）。并包含三个对照孔：趋化培养基（背景对照），1～100nmol/L 的 fMLP（趋化阳性对照；来自于 1mmol/L fMLP 的储存液）和 10～25ng/ml 的 SDF-1（阴性对照，来自于 10μg/ml 的 SDF-1 储存液）。

    见基本方案 1，步骤 3。

4. 准备好镊子和手套，在风干的 ECM 包被的滤纸一角做一划痕标记。将这个滤纸用镊子覆盖在底层趋化小室的孔中，并使得划痕位于左上角。调整滤纸的部位使得它能

覆盖周边的孔。但要避免调整过度以防止交叉污染。

5. 用附带的塑料垫片覆压住滤纸。通过下压垫片朝上的一面迅速安装好趋化小室装置，在垫片的中间和四周均匀用力以防止交叉污染和气泡的生成。确保拧紧金属螺帽。
6. 吸取 50μl 的细胞悬液（5×10^4～7.5×10^4个细胞）至趋化小室装置上部顶盖的孔中。将枪头抵在孔壁的上部小心的将液体排出，防止气泡产生。

   淋巴细胞的浓度从 10^5～10^7个细胞/ml 都能用于趋化性检测。更高浓度的细胞悬液（≥10^6个细胞/ml）能产生更好的趋化反应结果。

7. 在 37℃，5% CO_2的培养箱中培养 4h。
8. 移去没有迁移的细胞，固定滤纸并染色，并按基本方案 1（步骤 8～13）分析结果。但每孔要选取 5～10 个随机区域计数迁移细胞的数目。

辅助方案　细胞外基质蛋白包被聚碳酸酯膜

注：因为培养的时间较短，趋化实验的操作流程不需要严格无菌，但还是推荐采取无菌操作，防止其他的外在产物污染多孔微型趋化小室或滤纸。

材料（带√项目见附录 1）

细胞外基质蛋白，如人血浆纤连蛋白，小鼠 I 型或 IV 型胶原蛋白，或小鼠层粘连蛋白（均来自 Life Technologies）

√PBS

5μm 孔径的聚碳酸酯膜（Neuro Probe），聚乙烯基吡咯烷酮（PVP）包被与否均可

1. 准备细胞外基质蛋白的水溶液，浓度为 1～20μg/ml。

   为达到理想的 T 细胞反应，至少应预筛选 3～5 类 IV 型的胶原蛋白。I 型胶原蛋白、纤连蛋白、层粘连蛋白也能够用于淋巴细胞对各种趋化刺激趋化反应的检测。

2. 将聚碳酸酯膜（滤纸）的光泽面或粗糙面漂在培养皿内的 10ml 的蛋白质溶液液面上，37℃下放置 1h，或在 4℃下放置过夜，使滤纸一面大部分都能被包被。

   若将两面都包被，更多的 T 细胞会黏附在上表面，从而导致假阳性结果。

3. 先在 PBS 溶液里彻底地冲洗滤纸，再用趋化性检测试剂盒附带的特殊的滤纸夹子固定住滤纸并在层流通风橱中干燥（5～10min）。
4. 确保包被过的滤纸在无菌的时间内使用。

   若有需要，并经无菌技术处理，滤纸可保存一周以上，即放入无菌的基质混合液中包被之前，先将聚碳酸酯滤纸（非多层叠加）放置玻璃皿中高压灭菌，并将实验中所用夹子浸泡在 95%乙醇溶液中。

基本方案 2　趋化因子诱导的淋巴细胞内游离钙离子的检测

钙离子的荧光染料可分为几类，包括激发比染料（如 quin-3 和 fluo-3）、荧光染料（如 frug-2）和发射比染料（如 indo-1）。indo-1 和 frua-2 是钙离子螯合剂，与游离的钙离子结合后荧光性质发生改变。indo-1 能够在由氩或氪离子激光器发出的 350～360nm 的 UV 主波长内发光。结合钙离子的染料在约 402nm 处发光最强，而未结合染料的为 486nm。

下述的操作是使用indo-1检测趋化因子诱导后淋巴细胞内的钙离子的变化。当选用fura-2时，操作流程基本相同。也可用于粒细胞、单核细胞，以及T、B淋巴细胞 。

材料（带√项目见附录1）

√PBS

已分离的淋巴细胞（人外周血淋巴细胞，单元8.1；已分离的人或啮齿动物淋巴细胞，单元8.2～8.4和8.6；单核细胞，单元8.5；或粒细胞）

indo-1乙酰甲基酯（indo-1 AM；Molecular Probes）

Pluronic F-127，低UV吸光度级（Molecular Probes）

√RPMI-10完全培养基

10μg/ml的重组人或啮齿动物的趋化因子（如R&D Systems、Pepro Tech、Pharmingen、Biosource）

1mmol/L伊屋诺霉素

1μmol/L $CaCl_2$

10mmol/L $MnCl_2$

带有恒温比色皿的荧光分光光度计（如PE Biosystems），并配有磁力搅拌装置，在360nm处激发，在402～486nm处发射，并在计算机监控器上输出信息

1. 混合下列试剂及细胞并在室温下放置1h：

   1ml PBS

   已分离的1×10^6～2.5×10^6个细胞/ml的淋巴细胞

   1.25～2.5μmol/L的indo-1 AM

   50μl Pluronic F-127。

   Pluronic F-127，一种分散试剂，常用于促进染料的标记。

2. 用10ml的PBS，室温，300g离心清洗细胞。用新鲜培养基重悬至1×10^6～2×10^6个细胞/ml。室温条件下置于暗处直至检测前（4h以上）。

3. 吸取1ml已标记的细胞悬液（10^6个细胞）至37℃的恒温比色皿中，并装载磁力搅拌装置。

4. 开始检测细胞的荧光信号，用360nm光激发并收集发光信号。402nm（紫光）处为结合染料的，486nm（蓝光）处为未结合染料的。

   对于fura-2，在334nm处激发并在>490nm处发射。

5. 添加10μl的10μg/ml的重组人或啮齿动物趋化因子（终浓度100ng/ml），并继续监测2min。

   对于粒细胞和单核细胞，在实验中使用标准浓度的fMLP（10nm；Sigma）作为阳性对照。对于T淋巴细胞，使用抗CD3的MAb（500ng/ml）并混合抗小鼠的IgG抗体（1μg/ml）交叉结合至T细胞受体上。B细胞与之类似，使用小鼠抗人的IgG（500ng/ml）并混以抗小鼠的IgG抗体（1μg/ml）交叉结合到膜上所结合的免疫球蛋白。

6. 在细胞内已有1nmol/L的Ca^{2+}的情况下，用5μmol/L的伊屋诺霉素裂解一份细胞样品，测定最大荧光值（F_{max}）并监测荧光值。添加0.5nmol/L的$MnCl_2$至一份细

胞样品测定最小荧光值（F_{min}）。

根据细胞的类型以及正在检测的细胞群的激活状态，细胞内游离 Ca^{2+} 的水平在 50nmol/L 至 2μmol/L 之间变化。

7. 描述结果应为结合（紫光）荧光信号与游离（蓝光）荧光信号的比值。对所有样品来说，均可用下面的公式将荧光强度值转化为细胞内游离的钙离子浓度（nmol/L）。

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F}$$

式中，K_d 为 Ca^{2+} 和 inolo-1 的复合物在 250nm 处的分离常数。

参考文献：Mantovani，1999；Taub *et al.*，1995

撰稿人：Dennis D. Taub and Eric Schaffer

［万涛（单元 5.1～5.5） 孙卫民（单元 5.6～5.7）
刘书逊（单元 5.8～5.10） 吴艳峰（单元 5.11～5.13）］

第六章　天然免疫

天然免疫系统中多种免疫细胞均可识别入侵病原体和肿瘤细胞，正是这些细胞的快速应答构成了机体抵抗细菌、病毒、寄生虫感染的第一道防线并且参与恶变细胞的清除。树突细胞、NK细胞和巨噬细胞识别相应病原体后，通过上调细胞表面共刺激分子的表达，分泌多种细胞因子和趋化因子，发挥天然抗感染及抗肿瘤效应。除此之外，巨噬细胞和树突细胞还能吞噬损伤的细胞及其碎片。

本章开篇介绍了小鼠腹腔巨噬细胞的分离方法（单元6.1），根据不同的实验要求，此方法可用于正常未致敏小鼠或致敏后小鼠腹腔巨噬细胞的分离（单元6.4）。单元8.5介绍了人外周血单核细胞的分离方法。在此之前还介绍了人外周血单个核细胞（包括淋巴细胞和单核细胞）的分离方法（单元8.1）。接着介绍了小鼠和人巨噬细胞（单元6.2和单元6.3）表型的检测。不同分化阶段巨噬细胞的表型标志并不十分明确，单元6.2和单元6.3总结了目前所采用的小鼠和人单核吞噬细胞的鉴定方法，这些方法选用特定的单克隆抗体对相应细胞表面分子进行流式检测和分析（单元4.2）。

本章除了讨论巨噬细胞的分离和鉴定，单元6.10还介绍了人NK T细胞的分离方法。天然免疫系统中其他细胞的分离可参见单元2.4和8.3（分别是小鼠和人NK细胞）以及单元2.3和8.18（分别是小鼠和人树突细胞）。NK细胞的杀伤活性检测请参考单元8.14。

巨噬细胞可处于从静息到活化的不同状态。进入外周组织的新生单核细胞，其活性低于活化后的巨噬细胞，后者已经与环境中多种细胞或细菌等因素发生过相互作用。在细胞或环境因素等（细胞因子，如IFN-γ；细菌产物，如LPS）的作用下，巨噬细胞历经一个逐步成熟的过程，因而巨噬细胞的不同形态、功能和代谢特征代表其不同的活化阶段。巨噬细胞活化的多信号学说认为，在致敏因子（prime）的作用下，巨噬细胞首先进入一种无肿瘤杀伤活性的中间阶段，然后才能被LPS等激活（trigger），从而完全活化（具有肿瘤杀伤活性）。单元6.4介绍了一种常用的“致敏”然后“激活”小鼠巨噬细胞的方法。应注意的是诱导巨噬细胞活化的最佳方案应根据预实验相应调整。此外还应对巨噬细胞是否预先接触过某些活化因子、巨噬细胞及其前体细胞的来源、小鼠的品系和饲养条件以及巨噬细胞功能检测时所采用的方法等进行综合考虑。

人巨噬细胞分离方法中使用了的贴壁培养（单元8.5），这一操作会诱导某些细胞因子的表达，因此获得的巨噬细胞可能已被“致敏”。关于人巨噬细胞活化方面的研究目前开展较少，因此也缺乏诱导人巨噬细胞活化的标准方法。

对颗粒性物质的吞噬是巨噬细胞发挥生物学效应的起始环节，通过一系列反应最后清除细胞碎片、病原微生物和肿瘤细胞。巨噬细胞对不同物质的吞噬作用由表面不同的受体介导，如lectin样受体可识别微生物表面的糖基；玻连蛋白（vitronectin）和某些特定受体则识别凋亡相关表面分子；多种补体受体则介导巨噬细胞的吞噬作用。补体受

体，如 CR3 可与微生物表面吸附的补体裂解成分 C3bi 和 C3d 直接结合。FcR 通过与靶细胞（如肿瘤细胞和寄生虫）表面的抗体 Fc 片段结合，显著增强巨噬细胞的吞噬能力。单元 6.8 介绍了 FcγR 介导的巨噬细胞对绵羊红细胞（IgG 调理后）的吞噬作用。巨噬细胞不同亚群间 FcR 和其他受体表达水平的差异可影响其吞噬功能，最终导致杀菌活性（单元 6.6）以及肿瘤杀伤活性（单元 6.7）的差异。此外，某些外源因素（如细胞因子）可通过影响巨噬细胞受体的表达及其亲和力影响巨噬细胞的功能。单元 6.9 介绍了 IFN 介导的巨噬细胞抗病毒活性的检测方法。

巨噬细胞通过不同的机制杀伤胞内病原体和胞外靶细胞。目前已知一氧化氮（nitric oxide，NO）在巨噬细胞杀伤病原体的过程中发挥重要作用。单元 6.5 介绍了一种检测亚硝酸盐（NO^{2-}）的方法，它是 NO 的稳定型氧化产物。这种检测法的优点是所需巨噬细胞较少（可少至 5×10^5 个细胞）。

撰稿人：Ada M. Kruisbeek and Stefanie N. Vogel

单元 6.1　小鼠巨噬细胞的分离

注意：细胞培养所接触的试剂和器材应无菌。此外，由于巨噬细胞对内毒素非常敏感，所用试剂还应不含内毒素。巨噬细胞可与多种材质的器皿相黏附，为确保有效分离到巨噬细胞，实验时应使用聚丙烯材料的制品。所有试剂和细胞置 4℃备用。

基本方案 1　小鼠腹腔巨噬细胞的分离

材料（带√项目见附录 1）

小鼠，洁净环境中饲养（最好置层流柜中饲养）

√3%（*m/V*）脲蛋白胨或者 3%（*m/V*）Brewer 硫基乙酸盐肉汤（Brewer thioglycollate medium，分离炎性腹腔巨噬细胞用）

70%乙醇

收集用培养基：含 5%（*V/V*）FBS（Hyclone，无内毒素）的 DMEM（GIBCO/BRL）

Diff-Quik 染液 I、II 和 III（Baxter）

25G 针头

6ml 和 30ml 注射器

镊子和平头外科剪（浸于 70%乙醇中）

19G 针头

50ml 聚丙烯锥底塑料离心管，冰上预冷

离心机（Shandon/Lipshaw）

细胞甩片机（Shandon/Lipshaw）

Sorvall RT6000 离心机及 H1000B 转子（或替代品）

1a. 收集静息腹腔巨噬细胞时：断头或 CO_2 窒息处死小鼠（附录 2G）。

1b. 收集炎性腹腔巨噬细胞时：用 6ml 注射器吸取 1ml 3%脲蛋白胨肉汤。换用 25G 针头将肉汤注入小鼠腹腔（附录 2E）。3d 后断头或 CO_2 窒息处死小鼠（附录 2G）。也可腹腔注射 1ml 3%Brewer 硫基乙酸盐肉汤，5～7d 后收集细胞。

2. 70%乙醇消毒小鼠腹部。无菌剪开腹部毛皮，用镊子夹住腹部毛皮，向两边撕开，暴露完整腹膜。
3. 将 19G 针头装在 30ml 注射器上，吸取 10ml 收集用培养基。针尖斜面向上，在腹中线处刺透腹膜（附录 2E），将培养基注入腹腔。为防止刺破肠壁，在针尖穿过腹膜时，可推动针筒使少量培养基流经针头，进入腹腔。
4. 调整针尖斜面向下，轻轻挑起腹膜，慢慢吸回腹腔灌洗液（每只小鼠约 8ml）。将腹腔灌洗液加入冰上预冷的 50ml 聚丙烯塑料离心管中。
5. 取 20μl 腹腔灌洗液，计数（附录 3A）。
6. 取 0.2ml 腹腔灌洗液加入细胞甩片机中。按说明书，600r/min 离心 6min，制备细胞甩片。风干后，进行 Diff-Quik 染色，并计数。
7. 将剩余的腹腔灌洗液，4℃，400*g* 离心 10min，弃上清，轻弹管底，混匀细胞。加入收集培养基调整细胞至合适浓度。

一只小鼠可获得 2×10^6～3×10^6 个腹腔细胞，其中巨噬细胞占 50%～70%。脲蛋白胨或硫基乙酸盐肉汤腹腔注射后小鼠，每只可分别获得 3×10^6～4×10^6 个及约 10^7 个巨噬细胞。这些促炎剂可募集新生的、未成熟巨噬细胞至腹腔。

基本方案 2　小鼠骨髓巨噬细胞的分离和培养

材料（带√项目见附录 1）

小鼠，洁净环境中饲养（最好置层流柜中饲养）
√PBS
淋巴细胞分离液（LSM；Organon Teknika Cappel）
√含添加物的 EMEM 和 EMEM-10
小鼠特异性 CSF 或 IL-3（Genzyme）
II 型中性蛋白酶，1.0mg/ml（Boehringer Mannheim）
镊子和剪刀（浸于 70%乙醇中）
25ml 注射器
26G 针头
50ml 聚丙烯锥底塑料离心管，冰上预冷
15ml 聚丙烯锥底塑料离心管
Sorvall RT6000 离心机和 HB1000B 转子（或替代品）
$25cm^2$ 和 $75cm^2$ 细胞培养瓶（Corning）
无菌橡皮细胞刮子

1. 处死小鼠（附录 2G）。将小鼠后肢的皮毛剥至足部。连同褪下的皮毛剪去双足。剪下后腿，放入盛有无菌 PBS 的培养皿中。
2. 镊子夹住腿骨一端后，用剪刀剔除肌肉。在关节处剪断腿骨。

3. 25ml 针筒装上 26G 针头，吸取 2～5ml 无血清的 EMEM 或 PBS。将针头刺入骨髓腔（股骨或胫骨），冲洗骨髓。重复冲洗直至骨髓腔变白。将骨髓冲洗液加入冰上预冷的 50ml 锥底离心管中。
4. 室温，500*g* 离心 10min，弃上清，收集骨髓细胞。加入 3～5ml 无血清 EMEM 重悬细胞。
5. 在 15ml 离心管底部加入 5ml LSM，将 5ml 骨髓细胞悬液轻轻叠加其上。避免超过 LSM 分离液最高细胞负荷（一般情况下，5ml LSM 可分离 5 只小鼠的骨髓细胞）。室温，500*g* 离心 20min，缓慢减速。
6. 用 Pasteur 吸管或 5ml 枪头轻轻吸取界面层细胞，至新的离心管中，操作时将吸管头一直置于界面层，边缓慢移动吸管头，边轻吸界面层细胞。
7. 4℃，500*g* 离心 10min，收集界面层细胞。用 10ml 含血清的 EMEM-10 洗涤细胞，然后将细胞重悬于 EMEM-10 中，并调整浓度至 5×10^6 个细胞/ml（每只小鼠可获得 3×10^6～10×10^6 个细胞）。
8. 将 1×10^7～3×10^7 个骨髓细胞加入 25cm² 细胞培养瓶中，然后加入 10ml 含适量生长因子（CSF 或 IL-3）的 EMEM-10。细胞置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 24h。

   根据所用 CSF 不同，其用量需相应调整。一般说来，有效刺激半固体培养基中克隆形成的 CSF 浓度，即足够提供液体培养基中巨噬细胞生长所需。如 10ng/ml GM-CSF，或 IL-3，或 500～1000U/ml CSF-1。
9. 将悬浮细胞转移至 75cm² 细胞培养瓶中。加入 10ml 含生长因子的 EMEM-10，置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 4d。
10. 补充 10ml 含生长因子的 EMEM-10 培养基，继续培养 3d。
11. 吸弃细胞培养上清。加入 15ml PBS 洗涤贴壁细胞。
12. 用 PBS 配制 1.0mg/ml 的中性蛋白酶溶液（每瓶细胞需 5ml）。滤过除菌，预温至 37℃。
13. 吸弃 PBS。加入 5ml 中性蛋白酶溶液，37℃消化 5min。为避免细胞过度消化，最多同时处理 5 瓶细胞。
14. 轻拍培养瓶侧面振松细胞，用无菌橡皮细胞刮子沿同一方向轻轻刮下细胞（避免来回刮除）。
15. 加入 10ml EMEM-10 培养基，收集刮下的巨噬细胞。4℃，500*g* 离心 10min。用 3～5ml 培养基重悬细胞并计数（附录 3A）。

撰稿人：Anne H. Fortier and Lydia A. Falk

单元 6.2　小鼠巨噬细胞的表型检测

由于缺乏巨噬细胞或巨噬细胞不同分化阶段特征性的表面标志，目前根据不同类型巨噬细胞的表面分子表达谱，联合运用多种荧光素标记的单抗，经流式细胞仪检测后鉴定巨噬细胞。

基本方案 直标法检测小鼠巨噬细胞的表型

注：可用ATTRACTORS（Becton Dickinson Immunocytometry）或Winlist（Verity Software）软件进行FACScan结果分析。其他类似软件也能替代。

注：如厂商未明确说明，所有抗体和流式标记试剂（如TC标记的链亲和素）的最适浓度需根据预实验确定。除非特别指明，抗体稀释液和细胞洗涤液均为PBS。

材料（带√项目见附录1）

待测细胞悬液，浓度 2×10^7 个细胞/ml

阻断抗体，浓度3mg/ml（如正常小鼠IgG，Caltag）

荧光素标记的单克隆抗体（MAb，表6.2.1和表6.2.2）

表6.2.1 小鼠巨噬细胞表型鉴定用单克隆抗体

杂交瘤	命名	检测细胞	ATCC	参考文献
30-H12	THY-1	T细胞	TIB107	Lanier *et al.*, 1981
		巨噬细胞前体		Ledbetter and Herzenberg, 1979
MI/70	MAC-1	粒细胞	TIB128	Ho and Springer, 1982
		巨噬细胞		Ralph *et al.*, 1983; Springer, 1981
F4/80	—	巨噬细胞	HB198	Walker, 1987
		嗜酸性粒细胞		Walker, 1989
				McGarry and Stewart, 1991
HK1.4[a]	LY6c	粒细胞前体	—	McCormack *et al.*, 1991
		髓单核细胞		Havran *et al.*, 1988

a. HK1.4由美国芝加哥大学病理系W. L. Havran博士和F. W. Fitch博士提供。

表6.2.2 检测管和对照管中所加试剂[a]

试管编号			
1	2	3[b]	4[c]
F4/80-TC	F4/80-PE	—	EMA
30-H12-PE	MAC-1-FITC	—	—
Ly6c-Biotin	Ly6c-Biotin	—	—

a. 缩写：TC，Tandem Conjugate（PE-Cy5）；PE，藻红蛋白；FITC，异硫氰酸荧光黄；F4/80-TC和30-H12-PE购自Caltag公司；MAC-1-FITC购自Biosource International公司；F4/80-PE和Ly6c-Biotin购自Caltag公司。

b. 3号管（不加抗体），自发荧光对照管。

c. 4号管（加EMA，不加抗体），细胞活力对照管。

FITC标记的链亲和素和TC标记的链亲和素（Caltag）

√EMA（ethidium monoazide）溶液

√ACK裂解液（新鲜配制，室温保存应≤12h），推荐使用

√PBS

√2%（*m*/*V*）甲醛

12mm×75mm试管

低功率白炽灯（如40W白炽灯）

Sorvall RT 6000B 离心机

1. 准备 4 只 12mm×75mm 试管，将试管编号为 1～4。每管中加入 2×10^7 个细胞/ml 细胞悬液 50μl。
2. 每管加入 3mg/ml 阻断 IgG 4μl，4℃孵育 10min。
3. 按表 6.2.2 所示，在 1 号和 2 号管中加入适量的生物素偶联的单抗，然后将 1 号、2 号和 3 号试管冰浴 15min。
4. 在 4 号管中加入 5μl EMA，混匀。将试管置白炽灯（如 40W 白炽灯）18cm 远处，室温 10min。

   EMA 只能进入死细胞。利用死细胞的强染色性，在 FL1 和 FL3 双变量散点图上可与活细胞相区分。

5. 每管加入 3ml PBS，1500g 离心 3min。迅速倒掉上清，试管直立后，手指轻弹管底，使细胞沉淀变松。在 1 号管中加入 FITC 标记的链亲和素；2 号管中则加入 TC 标记的链亲和素。然后将 4 只试管冰浴 10min，其中 3 号管和 4 号管的细胞弹松即可，不需补加液体。
6. 样品含红细胞时（如新鲜分离的骨髓细胞或脾细胞），每管需加入 3ml ACK 裂解液；不含红细胞的样品，每管加入 3ml PBS。
7. 盖紧试管盖，颠倒试管 1～2 次，混匀细胞后，室温静置 3min。
8. 室温，1500g 离心 4min，迅速倒掉上清，试管直立后，轻弹管底使细胞沉淀变松。
9. 加入 3ml PBS 洗涤细胞，方法参见步骤 7 和 8。

10a. 直接检测时：加入 200μl PBS，混匀细胞，4℃避光待检（可保存≤4h）。

10b. 固定后检测时：每管加入 100μl 2%甲醛，混匀，加盖，4℃避光，固定 1h 后待检。

   甲醛会改变细胞的光散射值。

11. 用流式细胞仪进行检测，然后用 FACScan 分析结果（第四章）。

备选方案　间标法检测小鼠巨噬细胞的表型

附加材料（其他材料见基本方案）

待检细胞悬液，浓度 2×10^7 个细胞/ml

阻断IgG，浓度 3mg/ml（如二抗来源于羊，则用正常羊血清 IgG 作为阻断抗体）

未标记的大鼠抗小鼠一抗

荧光素标记的抗 $F(ab')_2$ 片段二抗（如一抗为大鼠抗小鼠，则标记二抗选用羊抗大鼠 IgG）

荧光素标记的小鼠 IgG

1. 准备 3 只 12mm×75mm 试管，分别标记为待测管、对照管 A、对照管 B。每管加入 50μl 待测细胞悬液（1×10^6 个细胞），再加入 4μl 浓度为 3mg/ml 的阻断 IgG，4℃（置冰上）孵育 10min。
2. 在待测管和 B 管中加入适量的未标记一抗（细胞不需洗涤）。A 管中加入等量的同型对照一抗。混匀，4℃孵育 15min。
3. 裂解红细胞（样品含红细胞时）及后续洗涤参见基本方案步骤 6～8。

4. 每管加入 4μl 浓度为 3mg/ml 的正常小鼠血清 IgG。冰浴 10min，以阻断二抗上非特异结合位点。
5. 每管加入适量荧光素标记的抗 F $(ab)'_2$ 片段二抗。混匀，冰浴 15min。
6. 按基本方案步骤 9 洗涤细胞。
7. 可选操作：细胞不经洗涤，直接在待测管和 A 管中加入适量的第二种荧光素标记的二抗。B 管中加入等量的荧光素标记的小鼠 IgG，用以检测步骤 6 的阻断效果。
8. 余下步骤参见基本方案步骤 9～11。

撰 稿 人：Mary C. Riedy and Carleton C. Stewart

单元 6.3　人单核/巨噬细胞的表型检测

基本方案

表 6.3.1 列出了几种膜分子的细胞分布情况，针对这些分子的相应单抗常用来鉴定人单核/巨噬细胞。

表 6.3.1　膜分子的细胞分布情况

膜分子	细胞类型
CD11b	粒细胞和巨噬细胞
CD16	NK 细胞、粒细胞和巨噬细胞
CD32	粒细胞、B 细胞、单核细胞和血小板
CD64	单核细胞和巨噬细胞
CD13	单核细胞、巨噬细胞和粒细胞
HLA-DR	造血前体细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和活化的 T 细胞
CD14	单核细胞、巨噬细胞和粒细胞
CD45	白细胞共同抗原

表 6.3.2 列出了几种荧光素标记单抗的供货商和相关资料。单核/巨噬细胞表达高水平的 FcR，为最低限度的减少 FcR 引起的非特异结合，建议尽可能选用荧光素标记的一抗，用直接法检测膜分子的表达。

表 6.3.2　人单核/巨噬细胞表型检测常用的单克隆抗体[a]

特异性抗原	克隆	抗体亚型	荧光素	供货商
CD11b	BearI	IgG1	FITC	Amac
CD16	3GA	IgG1	FITC	Amac
CD32	IV. 3	IgG2b	PE	Caltag
CD64	32. 2	IgG1	TC	Caltag
CD13	LI38	IgG1	PE	Becton Dickinson Immunocytometry
CD33	251	IgG2b	FITC，TC	Coulter
HLA-DR	HL38	IgG1	TC	Becton Dickinson Immunocytometry
CD14	MOP9	IgG2b	PE	Becton Dickinson Immunocytometry
CD45	J. 33	IgG1	FITC	Amac

a. 缩写：FITC，异硫氰酸荧光黄；PE，藻红蛋白；TC，Tandem Conjugate (PE-Cy5)。

表 6.3.3 列出了对单核细胞进行三色荧光标记时可采用的抗体组合。这些组合获得的双变量点图，具有特异性高和重复性好的优点。例如，骨髓来源的单核细胞采用组合 1 进行标记时，单核细胞均表达 CD45 和 CD14，但 HLA-DR 表达水平有异质性；采用组合 3 对单核前体细胞进行标记时，表现为高表达 HLA-DR 和 CD33，分化后的细胞 CD13 表达则上调，因此在双变量点图上呈现出连续性 CD13 阳性信号；同一细胞采用组合 4 标记时，测得的 CD33 分子荧光强度高于组合 3，因为组合 4 中 TC 标记的 CD33 单抗荧光强度高于组合 3 中使用的 FITC 标记的 CD33 单抗。因此，原则上应尽可能的采用强荧光素标记的抗体来检测表达水平较低的抗原分子。组合 5 中含同型对照抗体，用于检测 IgG 非特异性结合。EMA 只标记死细胞，这时可用 650nm 长通滤片检测。

表 6.3.3　细胞三色流式分析时每管所加荧光素标记抗体[a,b]

试管编号						
1	2	3	4	5	6	7
αCD45F	αCD16F	αCD33F	αCD11bF	IgG1F	—	EMA
αCD14PE	αCD32PE	αCD13PE	αCD13PE	IgG2bPE	—	—
αHLA-DRTC	αCD64TC	αHLA-DRTC	αCD33TC	IgG2aTC	—	—

a. 包括荧光素标记单抗和对照 Ig。

b. 缩写：α，抗；F，异硫氰酸荧光黄；PE，藻红蛋白；TC，Tandem Conjugate (PE-Cy5)。

注： 推荐用 Becton Dickinson 公司 ATTRACTORS 软件进行流式结果分析，其他类似软件也可替代。

注： 如果厂商未明确说明，所有抗体和标记试剂（如 TC 标记的链亲和素）的最适工作浓度需根据预实验确定。除非特别指明，抗体稀释液和细胞洗涤液均为 PBS。

材料（带√项目见附录 1）

待测单个核细胞（肝素抗凝血或肝素抗凝骨髓）或外周血单个核细胞（单元 8.1）或者单核/巨噬细胞（单元 8.5，推荐采用阴性分选）

√PBS

√PBS/肝素：含 0.1%（V/V）肝素的 PBS

阻断 IgG，浓度 3mg/ml（如正常小鼠 IgG，Caltag）

荧光素标记的单克隆抗体（表 6.3.2）

√EMA（Ethidium monoazide）溶液

√ACK 裂解液（新鲜配制，室温保存应≤12h）

√2%（*m/V*）甲醛

12mm×75mm 试管

15ml 锥底塑料离心管（Falcon）

低功率白炽灯（如 40W 白炽灯）

Sorvall RT6000B 离心机和转子

1a. 使用肝素抗凝血或抗凝骨髓时：在 15ml 锥底塑料离心管中加入约 10ml 抗凝血或 1～3ml 抗凝骨髓，4℃，1500*g* 离心 3min。弃血浆，加入 10ml PBS/肝素，盖紧，

颠倒离心管将细胞混匀。细胞离心后，用 15ml PBS 再洗涤一次。用 PBS 重悬细胞，调整浓度至 2×10^7 个细胞/ml。

1b. 使用 PBMC 或单核/巨噬细胞时：用 PBS 调整细胞浓度至 2×10^7 个细胞/ml。

2. 准备 7 只 12mm×75mm 试管，将试管 1～7 编号，每管加入 50μl 细胞悬液（1×10^6 个细胞）。

3. 加入 4μl 浓度为 3mg/ml 的正常小鼠 IgG，4℃（置冰上）孵育 10min。

4. 按表 6.3.3 所示，在 1～5 号试管中加入适量的一抗。将 1～6 号试管冰浴 15min。

   5 号管含同型对照 Ig，为非特异结合对照管。6 号管为细胞自发荧光对照，用于调定光电倍增管电压（photomultiplier，PMT），这一点对巨噬细胞的检测尤为重要。

5. 在 7 号管中加入 5μl EMA 溶液，混匀。将试管放在白炽灯（如 40W 白炽灯）18cm 远处，室温静置 10min。

6. 若样品含红细胞（如新鲜骨髓或脾脏），加入 3ml ACK 裂解液。否则，加入 3ml PBS。

7. 盖紧试管盖，颠倒试管 1～2 次，将细胞混匀后，室温静置 3min。

8. 4℃，1500*g* 离心 3min。倒掉上清，试管直立后，用手指轻轻弹松管底细胞沉淀。

9. 加入 3ml PBS 洗涤细胞，方法同步骤 7 和 8。

10a. 直接检测时：加入 200μl PBS 重悬细胞，4℃避光待检（可保存≤4h）。

10b. 固定后检测时：加入 100μl 2%甲醛，混匀，加盖，4℃避光固定 1h 后待检。

   甲醛会改变细胞的光散射值。

11. 用流式细胞仪进行检测，然后用 FACScan 分析结果

撰 稿 人：Mary C. Riedy and Carleton C. Stewart

单元 6.4 小鼠巨噬细胞的活化

注：细胞接触的所有试剂和器材应无菌。由于巨噬细胞对内毒素非常敏感，所用试剂还应不含内毒素。

基本方案 小鼠巨噬细胞的活化

巨噬细胞的活化经历两个阶段：致敏阶段和激活阶段。活化巨噬细胞的方案多采用一步法（致敏并且激活），本方案则明确区分巨噬细胞活化的这两个阶段。经过一段时间诱导后（48～72h），可检测巨噬细胞对病原体（如寄生虫或细菌；单元 6.5 和 6.6）的杀伤作用或所合成的活性氮介质（reactive nitrogen intermediates，RNI；单元 6.5）。

材料

小鼠巨噬细胞，静息状态（单元 6.1）

DMEM-10：含 10%（*V*/*V*）FBS（HyClone）和 50μg/ml 硫酸庆大霉素的 DMEM 培养基（GIBCO/BRL）

含 500U/ml 小鼠重组 γ-干扰素（IFN-γ，Pharmingen）的 DMEM-10

E. coli LPS（Sigma），浓度 5μg/ml，DMEM-10 配制

12mm×75mm 聚丙烯塑料试管，带盖（Falcon）

Sorvall RT6000 4℃离心机及 H1000B 转子（或替代品）

1. 用 DMEM-10 调整小鼠腹腔巨噬细胞浓度至 1×10^6 个细胞/ml。如下所示，准备 6 只 12mm×75mm 试管，每管分别加入 0.5ml 细胞悬液。

   未刺激组

   致敏组

   IFN-γ 激活的致敏组

   LPS 激活的致敏组

   IFN-γ 激活组

   LPS 激活组

2. 加入 1μl 浓度为 500U/ml 的 IFN-γ（终浓度 2U/ml），置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 4h，用以致敏巨噬细胞。

   实验室可摸索各自的技术方法，用以致敏巨噬细胞。例如，用不同浓度的 IFN-γ（0.1～10U/ml）刺激巨噬细胞来测定剂量反应曲线。

3. 加入 1ml DMEM-10，4℃，400*g* 离心 10min，弃上清。重复洗涤细胞 2 次后，加入 0.5ml DMEM-10 培养基重悬细胞。

4. 在相应试管中加入 5μl 浓度为 500U/ml 的 IFN-γ（终浓度 10U/ml）或 1μl 浓度为 5μg/ml 的 LPS（终浓度 10ng/ml）。置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 1h，用以激活巨噬细胞。

   用不同浓度的 IFN-γ（1～50U/ml）或 LPS（100pg/ml～100ng/ml）测定巨噬细胞对 IFN-γ 的剂量反应曲线。胞内、外的多种因子都能作为已致敏巨噬细胞的激活信号，这些分子均可替代 IFN-γ。

5. 加入 1ml DMEM-10，4℃，400*g* 离心 10min，弃上清。重复洗涤细胞 2 次后，将细胞重悬于 0.5ml DMEM-10 中备用。

辅助方案　炎性小鼠巨噬细胞的活化

炎性巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤作用较强。经过一段时间的贴壁培养后（约 48h），即可检测巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤作用（单元 6.7）或所合成的 RNI（单元 6.5）。

附加材料（其他材料见基本方案）

炎性巨噬细胞：促炎剂刺激后的小鼠腹腔巨噬细胞（单元 6.1）

24 孔平底细胞培养板（Costar）

1. 设置实验组和对照组（见基本方案步骤 1），在 24 孔板中每孔加入 0.5ml 细胞悬液。
2. 置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 1h 使巨噬细胞贴壁。
3. 弃上清后，沿孔壁缓慢加入 1ml DEMEM-10 培养基，避免破坏贴壁细胞层。重复洗涤 2 次，最后加入 0.5ml DEMEM-10 培养基。
4. 致敏及激活巨噬细胞，参见基本方案步骤 2 和 4。

参考文献：Fortier *et al.*，1992
撰 稿 人：Anne H. Fortier

单元 6.5 巨噬细胞一氧化氮的检测

基本方案

本方案通过检测活化后巨噬细胞（贴壁型或非贴壁型）培养上清中亚硝酸盐（NO_2^-）的含量，反映一氧化氮的分泌水平。

应通过预实验确定巨噬细胞致敏和激活所需 IFN-γ 和 LPS 的剂量以及刺激时间（表 6.5.1）。以 IFN-γ 和 LPS 共同刺激组作为阳性对照组。L-NMA 为 NO_2^- 合成所需底物的类似物，可抑制 NO_2^- 的产生，作为阴性对照组。

表 6.5.1 检测小鼠腹腔巨噬细胞氧化代谢所用激活剂

氧化代谢途径	体外激活剂	体内预处理
一氧化碳合成酶途径（合成 NO）	IFN-γ+TNF-α 或 TNF-β	无（静息细胞）
	IFN-γ+LPS 或微生物[a]	无（静息细胞）
	IFN-α 或 IFN-β+LPS	无（静息细胞）
	LPS 和（或）微生物	卡介苗（实验前 8d，腹腔注射）
	IFN-γ+LPS	激活（炎性巨噬细胞）[b]

a. IFN-γ 与某些微生物（如利什曼原虫、分枝杆菌）及其产物（如葡萄球菌内毒素）具有协同作用。

b. 腹腔注射蛋白胨或硫基乙酸盐肉汤，均可诱导炎性巨噬细胞的产生。这些试剂可增强巨噬细胞合成 NO 的作用。

此方法也可检测巨噬细胞对靶细胞（单元 6.6）或肿瘤细胞（单元 6.7）的杀伤作用，在这种情况下，步骤 5 中分别加入靶细胞或肿瘤细胞。

注：活细胞接触的所有试剂和器材应无菌。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠腹腔巨噬细胞（单元 6.1）

DMEM-5：含 5%（*V*/*V*）热灭活 FBS（HyClone）的 DMEM（GIBCO/BRL）

1mmol/L N^G 单甲基乙酸精氨酸（N^G-monomethyl-L-arginine acetate，L-NMA；Calbiochem 或 Research Biochemicals），PBS 配制，4℃保存

小鼠重组 γ-干扰素（IFN-γ，Genzyme）

0111：B4 型大肠杆菌 LPS（Sigma），肿瘤坏死因子 α（TNF-α；Genzyme）或其他激活剂

2mmol/L $NaNO_2$（Sigma），DMEM-5 配制，4℃保存

√Griess 试剂

12mm×75mm 带盖聚丙烯塑料细胞培养管（Falcon）

96 孔平底细胞培养板（Costar）

1. 收集小鼠腹腔巨噬细胞（单元 6.1），用 DMEM-5 调整细胞浓度至 1×10^6 个细胞/ml。操作非贴壁型巨噬细胞时：在 12mm×75mm 聚丙烯细胞培养管中加入 0.5ml 细胞悬液。操作贴壁型巨噬细胞时：在 96 孔平底培养板中，加入 0.1ml 细胞悬液。如下设置实验组和对照组，每组 2～3 复孔：
   - 第 1 组：未刺激组
   - 第 2 组：IFN-γ 刺激组
   - 第 3 组：LPS（或其他激活剂，如 TNF）刺激组
   - 第 4 组：IFN-γ 和 LPS 联合刺激组
   - 第 5 组：50～250μmol/L L-NMA、IFN-γ 和 LPS 联合刺激组
2. 操作贴壁型巨噬细胞时：将 96 孔细胞培养板置 37℃，5%CO_2细胞培养箱中培养 1～2h，使巨噬细胞贴壁。然后用 DMEM-5 培养基轻轻洗涤细胞 2 或 3 次。
3. 在第 5 组中加入 L-NMA，终浓度为 50～250μmol/L。
4. 在第 2、4、5 组中分别加入 IFN-γ（使巨噬细胞致敏），终浓度均为 0.1～10U/ml。
5. 在第 3、4、5 组中分别加入 LPS（使巨噬细胞激活），终浓度均为 2～10ng/ml。
6. 细胞培养 24～72h 后，取各组上清 50μl 分别加入 96 孔平底板中。
7. 将 $NaNO_2$溶液系列稀释（终浓度从 1～125μmol/L，各取 50μl 加入 96 孔平底板中）。
8. 在待测孔和 $NaNO_2$标准孔中加入 50μl Griess 试剂。最好先加入萘乙二胺（naphthylenediamine），然后再加入氨基苯磺酰胺（sulfanilamide）。
9. 用酶联仪检测 $NaNO_2$标准孔和各待测孔的光吸收值，测量波长为 550nm。用 $NaNO_2$标准孔的光吸收值和对应的浓度做一标准曲线（在 0～125μmol/L 范围内应呈线性相关）。用此标准曲线计算出各待测样品的 NO_2^- 值。结果以 NO_2^- 浓度值（μmol/L）或标准化换算后的 NO_2^- 摩尔值表示，即 10^5 个细胞或 1mg 蛋白样品的 NO_2^- 摩尔数（nmol/10^5个细胞或 nmol/mg 蛋白）。

本方法检测 NO_2^- 灵敏度为 1μmol/L 左右。

参考文献：Nathan and Gabay，1992

撰 稿 人：Shawn J. Green，Jacinta Aniagolu and Jennifer J. Raney

单元 6.6　巨噬细胞吞噬功能和杀伤功能的检测

注：实验时应准备酚溶液（Amphyl，Baxter Scientific；用水 1∶20 稀释后使用）或其他灭菌溶液。所有接触过活菌的器材包括枪头和玻璃试管，用后应立刻浸泡在灭菌液中。灭菌液浸泡后的玻璃试管还应仔细洗去残存的酚。实验台也应用酚溶液擦拭灭菌。塑料器材丢弃前须高压灭菌。实验过程中还应杜绝外源细菌对实验的干扰。

注：即使微量的抗生素也会影响实验的结果，因此实验过程中应避免使用抗生素。若待测细胞已用含抗生素的培养基培养，应将细胞洗涤 3 遍后，再用无抗生素的培养基培养至少 24h 以上后方可使用。

基本方案 1　巨噬细胞吞噬功能的检测

材料（带√项目见附录 1）

单核/巨噬细胞：如巨噬细胞株、小鼠腹腔巨噬细胞［单元 6.1，需用 10%（m/V）脲蛋白胨或 4%（m/V）硫基乙酸盐肉汤］，或人 PBMC（单元 8.1）

√平衡盐溶液（balanced salt solution，BSS）

细菌(如单核细胞增多性利斯特氏菌 *Listeria monocytogenes* EGD)，过夜培养，活菌或加热灭活（见辅助方案）

√正常血清，新鲜分离或新鲜融解，置冰上备用

√含 5%（V/V）FCS 的 PBS，冰上预冷

含 30%（m/V）蔗糖的 PBS（滤过除菌，4℃可保存数月）

Diff-Quik 染液（Baxter Healthcare）

10mm×75mm 聚丙烯塑料试管或聚苯乙烯塑料试管，带盖型

载玻片及盖玻片

振荡器（Labindustries）

Cytospin 2 型细胞甩片机（Shandon/Lipshaw）

1. 加入 10ml BSS，4℃，250*g* 离心 2min，洗涤单核/巨噬细胞，重复洗涤一次，弃上清。用 BSS 重悬细胞，调整浓度至 2.5×10^7 个细胞/ml，在 10mm×75mm 带盖塑料试管中加入 0.1ml 细胞悬液。
2. 将利斯特氏菌悬液置涡旋振荡器上混匀（约 2×10^9 个细菌/ml），用 BSS 稀释 10 倍。检测巨噬细胞的吞噬功能时，细菌经 BSS 稀释前应彻底吸净残存的细菌培养基。
3. 充分振荡混匀细菌（使成为单细菌悬液），将 0.1ml 细菌悬液加入上述带盖型试管中（每管 2.5×10^7 个细菌及 2.5×10^6 个细胞）。
4. 加入 50μl 冰预冷的正常血清，再加入 BSS 至终体积 1ml，盖紧试管盖。将试管置于振荡器上，37℃，8r/min 往复振荡 20～30min（不超过 30min）。

5a. 基本方法：4℃，250*g* 离心 8min，弃上清。加入 2 倍体积冰预冷的 BSS，用吸管轻轻混匀细胞。重复洗涤细胞 2 次，彻底除去胞外未被巨噬细胞吞噬的细菌。用冰预冷的 5%FCS/PBS 重悬细胞，调整至合适浓度（一般加入 2ml 后，细胞浓度为 10^6 个细胞/ml 左右）。

5b. 更严格的方法：同步骤 5a 洗涤细胞，但最后用 1ml 冰预冷的 BSS 重悬细胞。然后用 1ml 枪头将 1ml 含 30%蔗糖的 PBS 加入试管底，4℃，250*g* 离心 8min。小心吸去 BSS 和蔗糖后，加入冰预冷的 5%FCS/PBS 重悬细胞沉淀，调整至合适浓度（一般加入 2ml 后，细胞浓度为 10^6 个细胞/ml 左右）。

6. 将 0.1ml 细胞悬液（约 1×10^5 个细胞）加入甩片机中，室温，650r/min 离心 5min，将细胞固定至载玻片上。对于体积较大的巨噬细胞，细胞数量可酌情减少。
7. 按照说明书进行 Diff-Quik 染色。油镜下（放大 1000×）检测 200 个以上巨噬细胞，计录每个巨噬细胞吞噬的细菌数量，然后计算吞噬指数：

吞噬指数＝阳性吞噬细胞百分率(≥1个细菌)×阳性细胞中平均细菌数

辅助方案　利用 FITC 区分胞外黏附和胞内吞噬的细菌

Diff-Quik 染色法不易区分巨噬细胞吞噬的细菌和黏附于巨噬细胞表面的细菌，利用 FITC 标记则可鉴别。

附加材料（其他材料见基本方案 1）

热灭活的细菌，10^9 个细菌/ml（如单核细胞增多性利斯特氏菌 *Listeria monocytogenes* EGD；见辅助方案）

FITC（Sigma），0.1mg/ml，用 0.1mol/L，pH9.0 的 $NaHCO_3$ 配制

含 5%（*V/V*）FCS 及 5mmol/L 蔗糖的 PBS

EMA（ethidium monoazide）溶液

70℃水浴

荧光显微镜，配置标准长通荧光滤片和油镜

注意： EMA 为强致畸剂，操作时应戴手套，废液应妥善处理。

1. 将细菌室温，12 000*g* 离心 3min，弃上清。加入 1ml FITC/$NaHCO_3$ 重悬细菌，25℃标记 60min。
2. 加入 10ml PBS，4℃，250*g* 离心 2min，洗涤细菌。重复洗涤直至上清不含 FITC（通常需 4 遍）。加入 PBS 重悬细菌，调整浓度至 2.5×10^7 个细菌/ml。
3. 此时标记好的细菌可进行吞噬功能检测（见基本方案 1，步骤 5a 或 6b）。然后用 1ml 含 5%FCS 及 5mmol/L 蔗糖的 PBS 重悬细胞（终浓度 2.5×10^6 个细胞/ml）。
4. 取 100μl 细胞悬液，加入 EMA 使终浓度为 50μg/ml。
5. 立刻取 10～20μl 细胞悬液滴在载玻片上，盖好盖玻片。避光待检（≤2h）。
6. 样品置荧光显微镜下，采用长通 FITC 滤光片，油镜（1000×）观测。计数≥60 含细菌的巨噬细胞，鉴别被巨噬细胞吞噬的细菌（绿色荧光）和黏附于巨噬细胞表面的细菌（橙红色）。计算吞噬指数（见基本方案 1，步骤 7）。

   EMA 会缓慢进入巨噬细胞，使内吞的细菌染色，但所需时间较长，给鉴别留下足够的窗口期。

基本方案 2　巨噬细胞杀伤功能的检测

材料（带√项目见附录 1）

细菌（如单核细胞增多性利斯特氏菌、大肠杆菌或葡萄球菌），对数生长期。冻存的细菌接种于液体培养基后，培养过夜

√平衡盐溶液（BSS）

单核/巨噬细胞：如巨噬细胞株、小鼠腹腔巨噬细胞 [单元 6.1，改用 10%（*m/V*）脲蛋白胨或 4%（*m/V*）硫基乙酸盐培养基]，或人 PBMC（单元 8.1）

√正常血清，新鲜分离或新鲜融解，置冰上备用

含 5%（*m/V*）正常血清的 BSS，冰上预冷

无菌水

2 ml 锥底聚丙烯塑料试管，带螺口盖（Sarstedt），或 10mm×75mm 带盖锥底聚丙烯塑料试管

振荡器（Labindustries）

细菌培养板：如 TSA（tryptic soy agar）培养板（Remel；4℃储存，用前预热至 37℃）

13mm×100mm 硼硅酸玻璃试管，带螺口盖（Fisher 或 Coring），无菌

1. 将过夜培养的利斯特氏菌振荡混匀，用 BSS 稀释 300 倍。在 10mm×75mm 带盖塑料试管或 2ml 螺口盖塑料试管中分别加入下列成分：

   0.1ml 巨噬细胞悬液（2.5×10^6 个细胞）

   0.3ml 稀释后细菌悬液（2.5×10^6 个细菌）

   50μl 正常血清，冰上预冷

   补充 BSS 至终体积 1ml

   如怀疑巨噬细胞（如人肺泡巨噬细胞）可能已吞噬其他细菌，应另外设置一组不加利斯特氏菌的对照组。

2. 旋紧试管盖。将试管置振荡器上，37℃，8r/min 往复振荡 15～20min，使巨噬细胞充分吞噬细菌。充分洗涤去除未被吞噬的胞外细菌（见基本方案 1，步骤 5a 或 5b），将细胞重悬于 1ml 含 5%血清的 BSS 中。

3. 取 4 只螺口玻璃试管，每管加入 0.9ml 无菌水。在第一管中加入 0.1ml 细胞悬液（水只裂解巨噬细胞），在余下的 3 只试管中依次进行 10 倍系列稀释。不同试管间稀释时需更换枪头，并将细胞混匀。

4. 将各试管中液体充分混匀，各取 0.1ml 液体分别涂布在预热至 37℃的 TSA 细菌培养板上。

5. 将剩余的未稀释细胞悬液盖紧。37℃孵育 90～120min，使巨噬细胞充分杀伤细菌。然后将试管置冰上，抑制细菌生长。将细胞悬液进行 10 倍系列稀释并涂板，方法同上。

6. 待涂布的液体被琼脂吸收后，将细菌培养板倒置于 37℃孵箱，培养 24～28h。计数细菌克隆数，比较样品孵育前后细菌克隆数的变化（如 37℃孵育后细菌克隆数减少，说明细菌被巨噬细胞杀伤）。

   细菌培养使用标准 37℃孵箱而非 CO_2 饱和湿度细胞培养箱，对细菌培养来说，后者湿度过高。

辅助方案 单核细胞增多性利斯特氏菌的制备

材料

致病性单核细胞增多性利斯特氏菌（ATCC:15313 株），或其他细菌，如从患者分离培养的细菌

胰蛋白胨肉汤（Difco）

10mm×75mm 聚丙烯或聚苯乙烯塑料试管，带盖型

70℃水浴（推荐使用）

1. 将适量细菌接种到胰蛋白胨肉汤中（接种量根据细菌保存方式而定，如冻存、保存在半固体斜面培养基上或肉汤中），在 37℃水浴中振荡培养至对数生长期（4～6h）。
2. 将每份 0.5ml 菌液加到 10mm×75mm 带盖聚丙烯塑料试管中，－80℃保存备用（可保存≥1 年）。
3. 临用前将细菌解冻，用吸管取一滴（约 30μl）加到 5ml 细菌培养基中（如胰蛋白胨肉汤）。培养过夜至细菌达对数生长晚期或平台期（约 2×10^9 个活菌/ml）。
4. 对数生长早期细菌：取 1ml 菌液加到新鲜肉汤中，继续培养 4～6h。
5. 热灭活细菌：将对数生长期细菌置 70℃水浴，灭活 60min。4℃，900*g* 离心 20min，弃上清。加入 10ml PBS 洗涤细菌。最后用 PBS 重悬细菌，调整浓度至 10^{10} 个细菌/ml 左右（过夜培养的细菌一般为 2×10^9 个细菌/ml）。

参考文献：Drevets and Campbell，1991

撰 稿 人：Priscilla A. Campbell，Beth P. Canono and Douglas A. Drevets

单元 6.7 巨噬细胞抗肿瘤活性的检测

图 6.7.1 显示同位素标记肿瘤靶细胞和巨噬细胞抗肿瘤活性检测的流程图。

注意：［^{111}In］为强 γ 放射源，操作时应非常小心。严格按照操作规范，同时尽量减少暴露于同位素的时间。

注：活细胞接触的所有试剂和器材应无菌。除非特别说明，细胞均置 37℃，5% CO_2细胞培养箱中培养。

基本方案 ［^{111}In］释放法检测巨噬细胞对肿瘤细胞的杀伤作用

具有肿瘤细胞杀伤活性的小鼠巨噬细胞株，如 ANA-1 和 GG2EE（可与撰稿人联系）。小鼠原代巨噬细胞可新鲜分离。

注：进行巨噬细胞实验时，避免使用玻璃或聚苯乙烯材料的器材。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠巨噬细胞：细胞株或新鲜分离细胞（单元 6.1）

√无 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 HBSS 缓冲液，预热至 25℃和 37℃

√DMEM-10 或 RPMI-10 完全培养基，不含 2-ME，且 FBS 不含内毒素（如 HyClone 公司的 Defined FBS；56℃加热 30min 灭活），预热至 25℃和 37℃

待测试剂：检测是否能诱导巨噬细胞产生抗肿瘤活性

［^{111}In］标记的肿瘤靶细胞悬液，2.5×10^4 个细胞/ml（见辅助方案）

10%（*m*/*V*）SDS 或 0.5mol/L HCl（用于贴壁性肿瘤细胞）

50ml 锥底聚丙烯塑料离心管

96 孔圆底培养板（Dynatech）和培养板盖（Flow Laboratories）

Cornwall 连续吸样器（Becton Dickinson Labware）

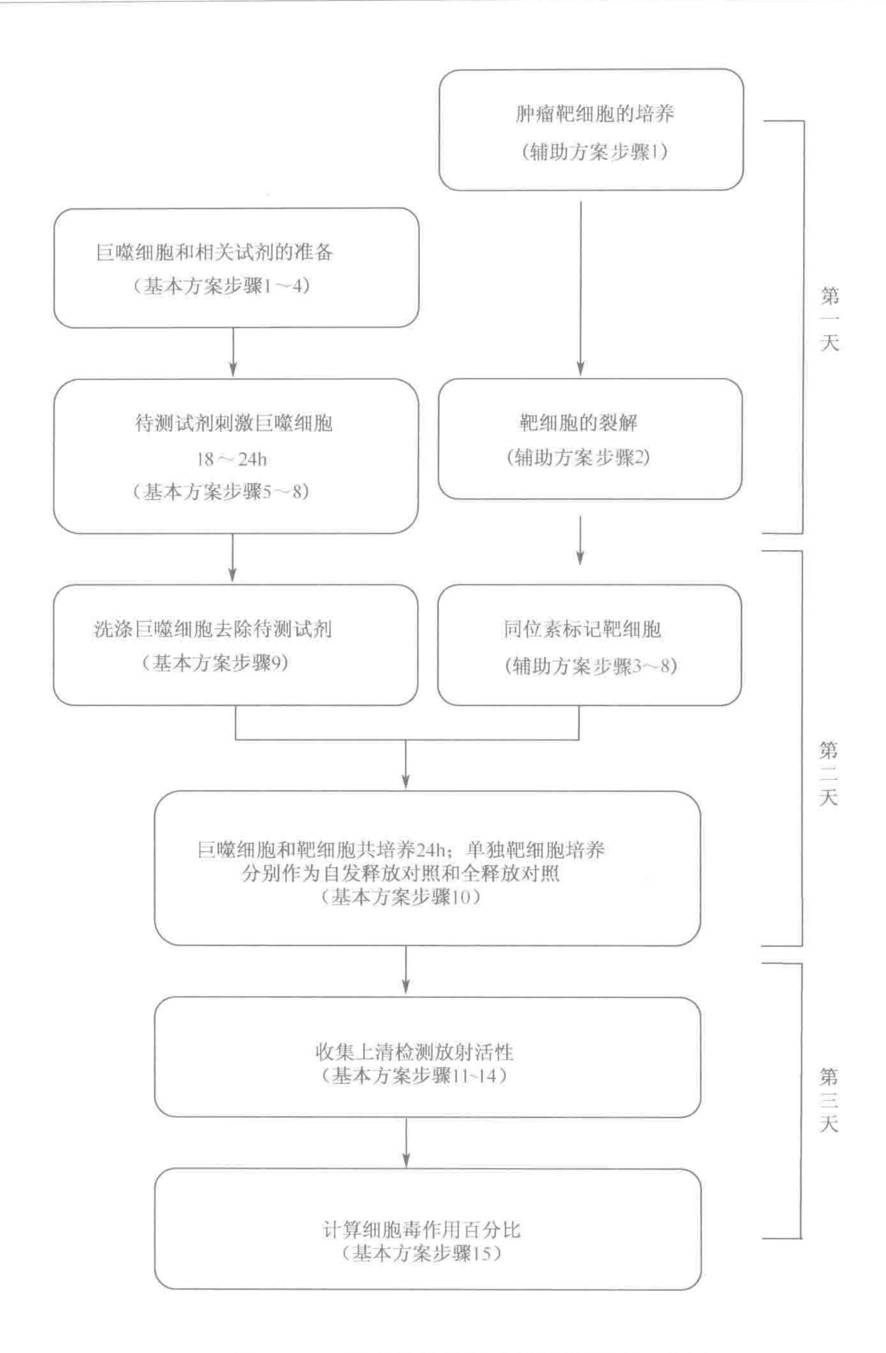


图 6.7.1　巨噬细胞抗肿瘤活性检测的流程图。

Sorvall RT6000 离心机及 H1000B 转子（或替代品）

1. 制备小鼠巨噬细胞悬液：将细胞加入 50ml 锥底聚丙烯塑料离心管，300*g* 离心 5min，弃上清，加入 10ml 25℃预热的 HBSS 缓冲液。再洗涤细胞 2 次，然后用 10ml 25℃预热的 DMEM-10 或 RPMI-10 完全培养基重悬细胞。
2. 台盼蓝拒染法检测细胞活力（附录 3C）。对于新鲜分离的巨噬细胞，还需用 Wright-

Giemsa 染色（附录 3D）以确定腹腔细胞中巨噬细胞百分比。

3. 调整巨噬细胞浓度至 4×10^6 个细胞/ml。

　　巨噬细胞最适浓度应根据巨噬细胞和肿瘤靶细胞的最佳效靶比（E/T）确定，而最佳效靶比可通过不同效靶比下的剂量反应曲线选定。如 P815 肿瘤细胞，本方案的最适 E/T 比为 40∶1（即每孔 200μl 培养基中含巨噬细胞 2×10^5 个，肿瘤细胞 5×10^3 个）。

4. 用 25℃预热的完全培养基稀释待测试剂，浓度为终浓度的 4 倍。

对于巨噬细胞株

5a. 在 96 孔圆底培养板加入 50μl 待检试剂，设 3 复孔。预留出中间 6 个孔（对照孔）和培养板四周所有孔（只加培养基，以减少待测孔的液体挥发）。

6a. 在待检孔中加入 100μl 25℃预热的完全培养基。

7a. 再加入 50μl 巨噬细胞悬液（每孔总体积 200μl）。

对于新鲜分离的巨噬细胞

5b. 在 96 孔圆底培养板中加入 50μl 巨噬细胞悬液，设 3 复孔。预留出培养板四周所有孔及中间 6 个孔不加细胞。培养 2h 使巨噬细胞贴壁。

6b. 洗去非贴壁细胞，然后每孔中加入 50μl 25℃预热的完全培养基。

7b. 在细胞孔中加入 50μl 待检试剂，设 3 复孔，再加入 100μl 25℃预热的完全培养基（每孔总体积 200μl）。

8. 在预留的四周边缘孔和中间 6 个对照孔中加入 200μl 完全培养基。培养 18～24h。

9. 用 37℃预热的 HBSS 洗涤细胞 3 次，彻底吸弃孔中残存的洗液。

　　对于非贴壁型巨噬细胞，其洗涤程序应相应调整，与贴壁细胞的洗涤方法不同，应先小心吸弃洗液，接着加入预热的 HBSS，然后将细胞培养板离心后，再吸弃洗液。重复 3 次。

10. 每孔加入 200μl [^{111}In] 标记的肿瘤细胞悬液（浓度 2.5×10^4 个细胞/ml），包括 6 个对照孔。培养 24h。

11. 将培养板 25℃，300g 离心 5min。

12. 取 100μl 细胞培养上清，包括 6 个对照孔中的 3 个孔（自然释放孔），分别加入预先编号标记的 γ 计数管中。

13a. 肿瘤靶细胞为悬浮细胞时：将剩余 3 个对照孔中（最大释放孔）的细胞轻轻吹打混匀。取 100μl 细胞悬液加入 γ 计数管中。

13b. 肿瘤靶细胞为贴壁细胞时：在剩余 3 个对照孔中（最大释放孔）加入 25μl 10% SDS 或 0.5mol/L HCl。吹打混匀后，取 100μl 细胞裂解液加入 γ 计数管中。

14. 按照说明书用 γ 计数仪检测实验孔和对照孔的 1min [^{111}In] 放射值。3 个空白孔的平均放射值作为本底，将样品孔和对照孔的平均放射值减去本底。

15. 计算巨噬细胞杀伤活性百分比：

$$\text{杀伤活性百分比}=\frac{(\text{实验组 cpm}-\text{自发释放组 cpm})}{(\text{最大释放组 cpm}-\text{自发释放组 cpm})}$$

常见问题指南见表 6.7.1。

表 6.7.1 巨噬细胞抗肿瘤活性检测常见问题指南

常见问题	建议解决方案
巨噬细胞杀伤活性低	调整 E/T 比。调整阳性对照组中活化剂的浓度。延长“活化”和（或）“裂解”作用时间。更换肿瘤靶细胞。选用适龄小鼠
巨噬细胞呈高水平自发杀伤	确保小鼠未受感染。巨噬细胞和肿瘤靶细胞应无菌培养。确保小鼠未接触过巨噬细胞活化剂（如 BCG）。选用无内毒素的培养基及试剂
肿瘤靶细胞呈现高水平［^{111}In］自发释放	避免肿瘤靶细胞过度生长（＞2～2.5×10^6个细胞/ml，特别是 P815 细胞）。细胞操作时，动作宜轻缓。选用对数生长期肿瘤细胞进行标记。同位素标记前检测细胞活力。［^{111}In］可非特异标记死细胞或濒死细胞。同位素标记细胞应在室温进行，时间不宜超过 15min。标记后肿瘤细胞应充分洗涤！标记后肿瘤细胞应尽快使用
肿瘤细胞标记效率低	查对［^{111}In］的生产日期，注意其半衰期只有 2.8 天！对照同位素衰变换算表，确定实验时同位素的实际放射活性。使用新鲜［^{111}In］。取对数生长期细胞进行标记，确保细胞处于最佳生长状态

辅助方案 ［^{111}In］标记肿瘤靶细胞

本方案以 P815 细胞株为例，此方法也适用于其他肿瘤细胞株，如 L5178Y、L1210、EL4、EMT-6、MCA26、L-929 和 WEHI-164（均购自 ATCC）。不同靶细胞的培养条件应根据预实验调整。巨噬细胞杀伤活性检测所用靶细胞应处于最佳生长状态。

材料（带√项目见附录 1）

肿瘤靶细胞：如肥大细胞株 P815（ATCC＃TIB 64）

√RPMI-10 完全培养基，预热至 37℃

1mCi/ml［^{111}In］羟基喹啉（Amersham Medi-Physics）

75cm^{2}细胞培养瓶

50ml 锥底聚丙烯塑料离心管

Sorvall RT6000 离心机及 H1000B 转子（或替代品）

1. 为确保实验时 P815 处于最佳生长状态，实验前每两天用新鲜 RPMI-10 将细胞传代，浓度 5×10^4个细胞/ml（如 75cm^{2}细胞培养瓶中加入 40ml 培养基，含 2×10^6个细胞）。这种条件下，每两天将细胞 1∶40 传代培养。
2. 同位素标记前一天，制备肿瘤细胞悬液，调整浓度为 4×10^5个细胞/ml（如 75cm^{2}细胞培养瓶加入 30ml 培养基，含 1.2×10^7个细胞）。
3. 标记当天，台盼蓝拒染法测定肿瘤细胞活力（附录 3C）。
4. 取 1×10^7个细胞加入 50ml 锥底聚丙烯塑料离心管中。室温，300g 离心 5min，弃上清，操作应轻。加入 10ml 25℃预热的 RPMI-10 洗涤细胞，然后加入 1ml 25℃预热的 RPMI-10 重悬细胞。

5. 加入 40μCi [111 In] 羟基喹啉。应根据 [111 In] 衰变系数（表 6.7.2）计算所需 [111 In]的正确剂量。

　　[111 In] 羟基喹啉放射活性强，但半衰期很短，正确计算实验当天放射活性尤为重要。

表 6.7.2　[111 In] 衰变表[a]

距离参考日期的时间/h	衰变系数	距离参考日期的时间/h	衰变系数
−48	1.642	90	0.394
−42	1.543	96	0.370
−36	1.451	102	0.348
−30	1.364	108	0.327
−24	1.282	114	0.307
−18	1.205	120	0.289
−12	1.132	126	0.272
−6	1.064	132	0.255
0	1.000	138	0.240
6	0.940	144	0.226
12	0.883	150	0.212
18	0.830	156	0.199
24	0.780	162	0.187
30	0.733	168	0.176
36	0.689	174	0.166
42	0.648	180	0.156
48	0.609	186	0.147
54	0.572	192	0.138
60	0.538	198	0.130
66	0.505	204	0.122
72	0.475	210	0.115
78	0.446	216	0.108
84	0.419	222	0.101

a. [111 In] 半衰期为 2.8d。衰变系数用于计算距离“参考日期”前后某一时刻的放射强度。负数代表参考日期前的时间。

6. 室温标记 15min。
7. 25℃，300*g* 离心 5min，弃上清。加入 25ml 25℃预热的 RPMI-10 培养基。重复洗涤细胞 2 次，弃上清，用 10ml 培养基重悬细胞。
8. 台盼蓝拒染法测定细胞活力，调整细胞浓度至 2.5×10^4 个细胞/ml（或合适的浓度）。

　　常见问题指南见表 6.7.1。

参考文献：Wiltrout *et al*.，1981

撰 稿 人：George W. Cox

单元 6.8 Fcγ 受体介导的黏附作用和吞噬作用的检测

注意：实验者须经严格培训后方可进行同位素^{51}Cr 的操作。操作人员在整个实验过程中应严格遵循实验规程，避免不必要的同位素射线照射，同时还应防止同位素沾染仪器设备。

注：活细胞接触的所有试剂和器材应无菌。除非特别说明，细胞均置于 37℃，5% CO_2的细胞培养箱中培养。

基本方案 Fcγ 受体介导的吞噬作用

材料（带√项目见附录 1）

原代巨噬细胞或巨噬细胞株（单元 6.1 和 8.5）
√RPMI-5 完全培养基（或其他培养基）
绵羊红细胞（SRBC），用 Alsever 溶液 1∶1（*V/V*）稀释（附录 1）
生理盐水：0.9%（*m/V*）NaCl
200～900 Ci/g $Na_2{}^{51}CrO_4$（30 000 Ci/mmol，ICN Biomedicals 或 DuPont NEN），生理盐水配制
多克隆抗 SRBC 抗体（如 Diamedix）或抗 FcγRI 单克隆 IgG2a 型抗体（即调理素，杂交瘤 S. S-1，ATCC）
√ACK 裂解液
0.5%（*m/V*）SDS 溶液
刺激剂（如小鼠 IFN-α/β；其他活化剂见单元 6.4）
8 道移液器（如 Costar Octapette）
96 孔平底细胞培养板（Falcon 或 Costar）
γ 液闪仪和 γ 液闪管
15ml 和 50ml 锥底离心管
IEC 离心机（临床型）
上清收集系统（SCS；Skatron）

1. 制备巨噬细胞悬液，调整浓度至 2.5×10^{6}个细胞/ml。用 8 道移液器在 96 孔平底培养板每孔中加入 100μl 细胞悬液。各实验组及对照组均设 3 复孔。置细胞培养箱中培养直至细胞贴壁（小鼠腹腔巨噬细胞需 4h 以上，其他分化较差的巨噬细胞可能需更长时间）。
2. 加入相应的刺激剂，以刺激巨噬细胞 FcγR 的表达。I 型干扰素，如 IFN-α 或 IFN-β，100U/ml，作用 48h 后能显著上调巨噬细胞 FcγR 的表达，可作阳性对照。单独培养基处理组作为阴性对照。

   不同刺激剂调节 FcγR 表达的最适浓度需根据预实验确定。
3. 将 γ 液闪管标记编号。

4. 在15ml锥底离心管中加入5ml SRBC，补充生理盐水至15ml。室温，300g离心10min，弃上清。用生理盐水再洗涤2次，每次加入15ml，最后用5ml生理盐水重悬细胞，并计数SRBC（附录3A）。
5. 在50ml锥底离心管中加入下列成分：1×10^9 SRBC、0.1mCi $Na_2{}^{51}CrO_4$和合适浓度的调理素，补充生理盐水至终体积1ml，轻轻混匀。另外设置一组不加调理素的阴性对照管。

   通过预实验确定调理素的最适工作浓度（此时具有最大吞噬活性）。如果已知调理素的凝集效价，预实验时即以此浓度或略低浓度作为最高起始浓度开始稀释。然后比较巨噬细胞刺激前后的吞噬活性，以确定调理素的最佳稀释度。

   本实验中1×10^9 SRBC足够进行两块半96孔培养板实验所需。

   注意：从现在开始，应遵循同位素操作规程进行实验。
6. 细胞置37℃水浴1h，每20min轻摇试管，混匀红细胞。
7. 加入生理盐水至终体积25ml，室温，300g离心10min。轻轻吸弃上清（注意：上清含同位素），避免吸起红细胞丢失。再洗涤红细胞一遍，然后用25ml培养基重悬细胞。4℃备用（可保存几小时）。
8. 为确定巨噬细胞吞噬作用的最大cpm值，将100μl SRBC悬液加到SCS滤纸上，放入γ液闪管中，进行γ液闪仪检测。设3复孔。

   SCS是一种醋酸纤维滤纸，可吸收细胞裂解液。每套48片，大小与96孔培养板相对应。使用时先去掉玻璃纤维的外包装，并在滤纸的一角做标记。检测时用镊子将48片滤纸按顺序放入相应的γ液闪管中。
9. 轻轻吸弃巨噬细胞培养上清。操作时避免触及细胞（否则细胞会被吸起而丢失），可在显微镜下检查是否有细胞丢失。
10. 在有巨噬细胞的培养孔中，加入100μl同位素标记且经抗体调理后的SRBC悬液。孵育一段时间（如小鼠腹腔巨噬细胞的最佳孵育时间为1h）。

    通过预实验确定吞噬作用呈线性增加的孵育时间（可能从30min～3h）。选定其中吞噬作用最强的时间点。
11. 小心吸弃培养上清。加入100μl培养基洗涤细胞。
12. 吸弃上清，加入100μl ACK裂解液。立即在倒置显微镜下观察SRBC裂解情况。裂解液作用时间长短以恰好完全裂解SRBC（10～60s）为宜。裂解期间将培养板置于摇床上，轻摇混匀细胞，不时在显微镜下观察SRBC裂解效果，注意：即使在显微镜下观察时也应不时轻轻晃动培养板，使裂解液充分作用于SRBC。特别注意观察位于孔底以及巨噬细胞间的SRBC是否被裂解。

    本步骤可裂解所有未被巨噬细胞吞噬的SRBC，包括黏附于巨噬细胞表面的SR-BC。需控制裂解液作用时间，使SRBC恰好完全裂解，时间过长则会导致巨噬细胞的裂解。
13. 吸弃细胞裂解液。加入100μl细胞培养基。
14. 加入100μl 5%SDS，室温作用5～10min以裂解巨噬细胞。
15. 用SCS吸收巨噬细胞裂解液2～5min。将SCS滤纸片放入相应的γ液闪管，用γ液闪仪检测。

16. 计算各样品 3 复孔的平均值及标准化值，复孔间的差异应<10%。

为综合分析不同实验的数据，可将数据进行标准化处理。首先计算出不同实验最大释放值的平均值，然后用样品值乘以各实验最大释放平均值除以该次实验的最大释放值即可得出样品的标准化值。

$$\text{样品的标准化值 cpm}=\frac{\text{样品值}\times\text{各实验最大释放平均值}}{\text{该次实验的最大释放值}}$$

17. 根据标准化值进行 t 检验。

实验结果也可用 SRBC 吞噬值表示，该值由样品值和最大释放值（步骤 8）计算得到。由于 SRBC 细胞总量已知（1×10^9 个细胞/25ml = 4×10^6 个细胞/100μl），因此

$$\text{SRBC 吞噬值}=\frac{\text{样品 cpm 值}\times 4\ 000\ 000}{100\mu l\ \text{SRBC 的最大释放 cpm 值}}$$

辅助方案　FcγR 介导的黏附作用

此方法检测巨噬细胞表面 FcγR 的表达，常用来验证某因素是否影响巨噬细胞的吞噬功能。

附加材料（其他材料见基本方案）

150mmol/L 碘乙酸（iodoacetic acid，IAA；新鲜配制，避光保存）

24 孔平底细胞培养板（Costar 或 Falcon）

振荡器，培养板型

1. 制备巨噬细胞悬液，调整浓度至 8×10^5 个细胞/ml。在 24 孔板中加入 500μl 细胞悬液。各实验组和对照组至少设 2 复孔。24 孔板置细胞培养箱中培养待细胞贴壁后，加入刺激剂（见基本方案，步骤 1 和 2）。
2. 制备同位素标记且抗体调理的 SRBC（见基本方案，步骤 4～7）。在 9.9ml SRBC 悬液中加入 0.1ml 150mmol/L 碘乙酸，抑制巨噬细胞吞噬功能。
3. 将 100μl SRBC 上清加至含 SCS 的 γ 液闪管中，读取 cpm 值（此值为巨噬细胞最大黏附 cpm 值的 1/5）。
4. 吸弃巨噬细胞培养上清。加入 500μl 碘乙酸处理后的 SRBC 悬液，孵育 1h 或合适的时间（见基本方案，步骤 10）。
5. 轻轻吸弃未黏附的 SRBC 悬液。用 1ml 移液器沿孔壁缓慢加入 500μl 培养基洗涤细胞，避免吹起巨噬细胞。重复洗涤 3 次，充分洗去未黏附的 SRBC。

   注意：应在一块培养板洗涤全部结束后再开始第二块培养板的洗涤。
6. 加入 500μl 浓度为 0.5%的 SDS，轻摇培养板约 10min，裂解巨噬细胞。
7. 将 γ 液闪管编号标记，加入 SCS 滤纸。用 1ml 移液器吸取 400μl 巨噬细胞裂解液，小心加到相应的 γ 液闪管中，用 γ 液闪仪检测 cpm 值。
8. 计算各样品的平均值（见基本方案，步骤 16～17）。结果以 SRBC 结合量表示时，应将 400μl 裂解液的 cpm 值换算成 500μl 裂解液总量的 cpm 值。

撰 稿 人：Alexander D. Politis and Stefanie N. Vogel

单元 6.9　干扰素介导的抗肿瘤作用

基本方案

本法适用于新鲜分离，或培养的静息，或炎症性巨噬细胞。polyI：C 或 LPS 小鼠体内注射或体外刺激均可诱导巨噬细胞分泌干扰素。某些病毒或细菌也具有类似作用。检测人巨噬细胞时，需用 EMC 替代水泡性口膜炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV）（单元 5.12）。

注意： VSV 具有潜在致病性，所有接触 VSV 的器材（如枪头和试管）应高压灭菌。甲醛固定前，含病毒的培养上清应放入含氯消毒液中。

注： 细胞培养采用无菌操作，所用试剂应无菌且不含内毒素。细胞置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠巨噬细胞，腹腔灌洗液、骨髓或其他来源（单元 6.1）
√含添加物的 RPMI-10 培养基
VSV 病毒（印第安纳株；单元 5.12），－70℃保存
√PBS
5%（V/V）甲醛
结晶紫染液：0.05%（m/V）结晶紫，溶于 20%乙醇
100%甲醇
96 孔平底培养板（Falcon）
负压吸引器，通过负压管连接装有消毒液的烧瓶
酶联仪（Bio-Tek 公司或类似仪器）

1. 用 RPMI-10 培养基调整巨噬细胞浓度至 1×10^6 个细胞/ml。在 96 孔培养板中加入 200μl 细胞悬液，设 2 复孔。需设置不加病毒的细胞对照组，以及不加细胞的病毒对照组。细胞置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 6h，使巨噬细胞贴壁。
2. 融解 VSV 病毒，用 RPMI-10 培养基稀释至每 100μl 病毒悬液的感染复数 MOI 值为 0.1 个病毒/1.0 个细胞。对于高感染抗性的细胞可提高感染复数。
3. 轻轻吸弃上清，避免破坏巨噬细胞单层，因为细胞间隙会影响染色结果。
4. 在实验孔中加入 100μl 病毒悬液，对照孔中则加入 100μl RPMI-10 培养基。置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 24h。
5. 吸弃上清，加入 200μl PBS 洗涤细胞。弃洗液，加入 200μl 5%甲醛，室温固定 10min。
6. 吸弃固定液，加入 50μl 结晶紫染液，室温染色 10min。活细胞可被着色。
7. 吸弃染色液，在孔中加满水，轻轻甩干培养板中的水。重复洗涤 5 次。
8. 加入 100μl 甲醇，轻摇培养板使染料脱色。用酶联仪检测样品的光吸收值，波长为

595nm。计算细胞病变率（cytopathic effect，CPE）。

细胞染色程度从轻度着色（如完全细胞病变的细胞）到明显着色（如未感染对照组或分泌高水平 IFN 的细胞）范围内变化。

参考文献：Vogel and Fertsch，1987

撰 稿 人：Lydia A. Falk

单元 6.10 人 NK T 细胞的分离和扩增

注意：进行人源样品操作时应小心，这些样品可能具有感染性。

注：实验中所用单抗的效价需通过预实验确定。抗体经适当稀释后，用 0.22μm 滤器过滤除菌备用。

基本方案 1 NK T 细胞的鉴定

本方案可对微量的 NK T 细胞进行鉴定和定量分析。应采取有效措施阻断非特异染色，以获得可靠的实验结果。本实验联用两种单抗以确保结果的特异性。

可用抗 6B11 单抗检测 Vα24-JαQ CDR3（不依赖 TCR-Vβ），由于抗 6B11 单抗也能非特异性结合单个核细胞（尽管较弱），因此为提高实验的特异性应联用抗 6B11 和抗 Vα24。

材料（带√项目见附录 1）

外周肝素抗凝血
√PBS
RPMI-1640 培养基，含 10%（*V/V*）人血清或 FCS 以及 10U/ml IL-2（可选）
流式细胞缓冲液（flow cytometry buffer，FC buffer）：含 1%（*V/V*）人血清、1%（*V/V*）FBS 和 0.1%（*m/V*）叠氮钠的 PBS
荧光素标记的抗 Vα24 单抗（clone C15B2，PE 或 FITC 标记，Coulter-Immunotech）
荧光素标记的抗 Vβ11 单抗（clone C21D2，PE 或 FITC 标记，Coulter）
荧光素标记的同型对照抗体（BD Pharmingen）
荧光素标记的抗 6B11 单抗（BD Pharmingen；可选）
Cy5 标记的抗 CD4 单抗、Cy5 标记的抗 CD8 单抗（BD Pharmingen，可选）
荧光素标记的抗 CD161 单抗（Coulter，推荐使用）
荧光素标记的其他相关抗体（可选）
含 4%甲醛的 PBS（PBS with 4% paraformaldehyde，PFA）：配制时置通风橱中，加热至 80℃，可搅拌以加速溶解，冷后分装，−20℃保存
0.5ml 微量离心管或 96 孔细胞培养板
流式细胞仪

1. 准备人外周肝素抗凝血（5～10ml），根据情况，室温可保存 1d。Ficoll-Hypaque 密

度梯度离心法分离 PBMC（单元 8.1；每毫升血可获得 $1\times10^6\sim2\times10^6$ PBMC）。分离的 PBMC 可用含 10%人血清或 FCS 及 10U/ml IL-2 的 RPMI-1640 培养过夜（或更长些时间）。

2. 加入 15ml PBS，室温，300g 离心 6min，洗涤 PBMC 两次。用 FC 缓冲液重悬细胞，调整浓度为 2×10^7 个细胞/ml。冰浴 15min 后，4℃备用。
3. 在 0.5ml 离心管或 96 孔细胞培养板中加入 50μl 细胞悬液。
4. 加入 PE 标记的抗 Vα24 单抗和 FITC 标记抗 Vβ11 单抗（各 1μg），至终体积 100μl。4℃标记 20～40min，孵育期间应不时轻轻混匀细胞。对照设置包括：单独同型抗体组、同型抗体与抗 Vα24 单抗组、同型抗体与抗 Vβ11 单抗组。

   可用标记的抗 6B11 单抗代替标记的抗 Vβ11 单抗。
5. 可选操作：为更好地分析 NK T 细胞，可加用其他直标型抗体（如抗 CD4、CD8、CD56 或 CD161 的抗体）或者选用生物素偶联的一抗与 Cy5 或 APC 标记的链亲和素间标系统。后者应另外设链亲和素二抗对照组。
6. 用 FC 缓冲液洗涤细胞 1 次，加入 0.5ml FC 缓冲液重悬细胞。
7. 标记好的样品应在数小时内用流式细胞仪检测（推荐使用），细胞经固定后，可保存更长时间。细胞固定方法如下：用冰预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次后，加入 0.3ml 冰预冷的 PBS，用枪头轻轻吹打混匀细胞，再加入 0.1ml 4%PFA 的 PBS，冰上固定 5min，并不时轻摇混匀细胞。最后将固定好的细胞洗涤 1 次，重悬于 FC 缓冲液中，置 4℃待检。
8. 以淋巴细胞设门，分析 10^5 个以上的淋巴细胞，比较不同样品间 NK T 细胞的差异（流式分析见单元 4）。

   用前散射角和侧散射角作点图，对活细胞设门。死亡细胞也可用 PI 染色，然后对 PI 拒染的活细胞设门，从而剔除死细胞背景。此时，实验步骤几乎同前，唯一不同的是，由于 PI 荧光与 PE 的检测通道重叠，因此应使用其他荧光素标记的抗体代替 PE 标记的抗体。例如，用生物素偶联的抗 Vα24 单抗代替 PE 标记的抗 Vα24 单抗，检测时相应的改用 Cy5 或 APC 标记的链亲和素二抗。需指出的是，此时应设置一组只加 Cy5 或 APC 标记的链亲和素二抗的对照组。细胞经过标记和洗涤后（步骤 6），加入 50μg/ml PI，并立刻用流式细胞仪进行检测，而且 PI 染色的细胞不能固定。

基本方案 2　免疫磁珠法分离 NK T 细胞及后续扩增

本法可从几毫升的外周血中分离和扩增 NK T 细胞（<10 000 NK T 细胞），浓缩白细胞（分离血小板时的副产品）也可作为 NK T 细胞的来源。

材料（带√项目见附录 1）

外周肝素抗凝血
PBS，含 2mmol/L EDTA（附录 1）
未标记的抗 Vα24 单抗（Coulter）
未标记的抗 6B11 单抗，即抗 TCRα 单抗（BD Pharmingen）

羊抗小鼠 IgG 磁珠（Miltenyi Biotec）

结合缓冲液：含 2mmol/L EDTA 和 2%（V/V）人血清的 PBS

√T 细胞培养基

含 90%（V/V）FBS/10%（V/V）的二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）

α-GalCer（α-galactosyl ceramide；Kirin Brewery）

人 IL-2

MS 或 LS 分离柱（起始细胞量分别低于 10^8 个或 10^9 个；Miltenyi Biotec）

磁铁架（miniMACS 或 midiMACS，Miltenyi Biotec）

γ 辐照源

96 孔圆底细胞培养板或 96 孔平底细胞培养板

1. 取 50～100ml 外周肝素抗凝血，Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC（单元 8.1；可获得≥10^8 个细胞）。
2. 加入 15ml PBS/EDTA，室温，300*g* 离心 6min，洗涤细胞 2 次。用结合缓冲液重悬细胞，调整浓度为 10^8 个细胞/ml，冰浴 15min。
3. 加入未标记的抗 Vα24 单抗或未标记的抗 6B11 单抗（每 10^8 个细胞加入 10μg），终浓度约为 10μg/ml，冰浴 20～30min。
4. 加入 PBS/EDTA，4℃，700*g* 离心 30s，洗涤细胞 2 次。将 10^8 个细胞重悬于 0.8ml 结合缓冲液中。加入 0.2ml 羊抗小鼠 IgG 磁珠，冰浴 20～30min，期间时应不时混匀细胞。
5. 将 MS 或 LS 分离柱安装在磁铁架上，用 3ml 结合缓冲液预洗涤分离柱。在磁珠标记的细胞悬液中加入适量 PBS/EDTA，室温，700*g* 离心 30s，洗涤细胞 2 次。用 1ml 结合缓冲液（室温）重悬磁珠标记的细胞，然后将细胞悬液加入分离柱中。
6. 用 PBS/EDTA 洗涤分离柱 3 次，每次 3ml，收集流穿液（含未被磁珠结合的细胞）。从中取出约 10^7 个细胞，经照射灭活后用作饲养细胞。
7. 从磁铁架上取下分离柱，加入 3ml PBS/EDTA，将磁珠结合的细胞洗脱下来。如果预实验显示阳性细胞不能达到预期纯度，可将洗脱的阳性细胞再次过柱分离。
8. 加入 10ml T 细胞培养基，室温，300*g* 离心 6min，将阳性细胞洗涤 1 次。用 0.1ml T 细胞培养基重悬细胞并计数。

   用流式细胞仪分析阳性细胞，测定磁珠分离效果（如果后续实验中未扩增出 NK T 细胞，流式分析则尤为重要）。考虑到 NK T 细胞的含量较低，可加大 PBMC 的起始用量。
9. 照射灭活（3000～5000rad）未结合磁珠的 PBMC（步骤 6），用作饲养细胞。如计划进行第二轮刺激，将饲养细胞悬液（照射前或照射后）每支 1.0ml，用 90%FBS/10%DMSO 冻存液冻存备用（置冻存盒内－80℃过夜后，转入液氮中长期冻存）。使用预先冻存的 PBMC 作为饲养细胞时，如果台盼蓝拒染法（附录 3A）检测细胞活率小于 40%，应将细胞充分洗涤后，用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法重新分离 PBMC。
10. 在 96 孔板中加入等量的照射灭活后自体 PBMC 和分离的 NK T 细胞（96 孔圆底板每孔最多加入 10^4 个细胞，96 孔平底板每孔最多加入 10^5 个细胞），然后加入 20ng

α-GalCer，用 T 细胞培养基补足至 200μl。培养板置 37℃，10%CO_2（10%CO_2用于细胞密度较低时）细胞培养箱中培养 1～2d。

11. 1～2d 后加入 100U/ml 人 IL-2，继续培养（不更换培养基）2 周左右（其间会观察到许多母细胞集落，母细胞圆形，体积较大）。
12. 轻轻吸弃约 150μl 培养基，补充含 IL-2 的新鲜 T 细胞培养基。每隔 2～3d 重复换液，直至母细胞布满整个孔底。将细胞 1∶2 传代至新的 96 孔板中；细胞生长过快时，可将 96 孔平底板孔中的细胞传到 24 孔板中。根据细胞增殖情况，继续传代培养（大约几周）。
13. 当细胞增殖变缓或停止时，可用饲养细胞或丝裂原进行二次刺激（见辅助方案）。如用此静息细胞进行功能实验，则将细胞转入低浓度 IL-2（10U/ml）的 T 细胞培养基中。为防止细胞死亡，应用一周左右时间逐步将 IL-2 浓度从 50～100U/ml 降至20～10U/ml。
14. 用流式细胞仪检测扩增培养的 NK T 细胞的纯度，一般情况下，外周血来源的 NK T 细胞扩增后纯度应大于 90%。
15. 参照细胞冻存法，将 NK T 细胞冻存。冻存时应选用活化状态而非静息状态的 NK T 细胞，冻存液为 90%FCS/10%DMSO，每支冻存 1×10^5～2×10^5个细胞。

备选方案 1 NK T 细胞的流式分选及扩增

附加材料（其他材料见基本方案 1 和 2）

FACS 缓冲液：含 1%（V/V）人血清及 1%（V/V）FBS 的 PBS
高速 FACS 分选仪（MoFlo，Cytomation）

1. 取 50～100ml 外周抗凝血，Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离≥10^8 PBMC（单元 8.1）。取出部分细胞，经照射灭活后用作饲养细胞。
2. 在剩余细胞中加入 15ml FACS 缓冲液，25℃，300g 离心 6min，洗涤 2 次。然后用 FACS 缓冲液重悬细胞，调整浓度至 10^7～10^8个细胞/ml，冰浴 15min。
3. 取 0.1ml 细胞悬液，加入 1μg FITC 标记的同型对照抗体作为对照组。剩余细胞加入 FITC 标记的抗 Vα24 单抗，终浓度 10μg/ml。冰浴 30min。
4. 流式分析并选定 $V\alpha24^+$细胞群（含量<1%），用高速 FACS 仪进行分选。为提高细胞活力，应直接将分选的细胞放入含 T 细胞培养基的试管中。

   可选操作：取部分细胞用抗 Vα24 和抗 Vβ11（或 6B11）双标精确选定 NK T 细胞群。以便 FACS 分选时利用这些参数对单色标记的 NK T 设门。

5. 用 T 细胞培养基将分选的细胞洗涤 1 次（见基本方案 2），加入照射灭活的自体 PBMC 共培养，然后用 α-GalCer 选择性扩增。

备选方案 2 NK T 细胞的克隆

附加材料（其他材料见基本方案 1 和 2）

T 细胞克隆培养基：RPMI-1640，含 10%（V/V）自体人血清、20U/ml IL-2 及 20U/ml IL-7

植物血凝素 P（phytohemagglutinin-P，PHA-P；Difco）

1. Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC（单元 8.1）。取出部分细胞，照射灭活后用作饲养细胞。
2. 剩余细胞用 PBS 洗涤一遍，加入含 10%人血清的 PBS 重悬细胞，调整浓度为 10^8 个细胞/ml，冰浴 15min。
3. 加入荧光素标记的抗 Vα24 单抗和另一种荧光素标记的抗 Vβ11 单抗（或标记的抗 6B11 单抗，推荐使用），终浓度均为 10μg/ml，冰浴 30min。同时，取部分细胞加入相应的同型对照抗体。
4. 在 96 孔圆底培养板中加入 10^5 照射灭活后（5000rad）的自体饲养细胞和 PHA-P（终浓度 2μg/ml），补充 T 细胞克隆培养基至终体积 0.1ml。同时用流式分选仪分选 $Vα24^+Vβ11^+$（或 $6B11^+$）双阳性细胞，分选出的细胞应直接加入上述 96 孔板中。
5. 一周后，每孔加入 0.1ml T 细胞克隆培养基（不含 PHA-P）。显微镜下观察细胞生长情况：10～14d 后，阳性孔中会出现一个或多个母细胞克隆（母细胞圆形，体积较大，每个克隆细胞数超过 100 个）。
6. 根据克隆生长情况，每隔 2～3d 用 T 细胞克隆培养基传代。如果用自体血清进行 T 克隆，当细胞扩增后，每次传代时培养基中增加 25%的异体人血清或 FBS，直至完全取代自体血清。
7. 当细胞数量足够时，用流式细胞仪检测不同克隆的 Vα24 和 Vβ11（或 6B11）表达情况。

3～4 周后，细胞可进行二次刺激，或者在 T 细胞克隆培养基中继续培养几周。

辅助方案 NK T 细胞的二次刺激和克隆

材料（带√项目见附录 1）

外周肝素抗凝血或浓缩白细胞

√PBS

B 细胞株（JY 或 C1R）

√扩增培养基

小鼠抗人 CD3 单抗，如 UCHT1（IgG1，Ancel）或 OKT3

$25cm^2$ 细胞培养瓶

1. Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC（单元 8.1）。用 PBS 洗涤 PBMC 细胞，由于 Ficoll 对 APC 及 NK T 细胞克隆有毒性，因此应至少洗涤 3 次。取部分 PBMC 细胞，经 5000rad 照射灭活后作为饲养细胞，同时制备照射灭活后的人 B 细胞（JY 或 C1R）作为饲养细胞。
2. 取静息期 T 细胞（距离最后一次抗原或丝裂原刺激大约 2 周时间）进行刺激。注意起始时培养基应不含 IL-2（否则会导致细胞凋亡）。
3. 第 0 天，在 $25cm^2$ 细胞培养瓶中加入 5×10^4～10×10^4 个 T 细胞、2.5×10^7 照射灭活的 PBMC、5×10^6 照射灭活的人 B 细胞以及抗 CD3 单抗（终浓度为 30～50ng/ml），用扩增培养基补充体积至 15ml。将细胞置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养。

4. 第 1 天，加入重组 IL-2 及 IL-7 各 50U/ml。
5. 第 5 天，用新鲜培养基进行半量换液，维持各细胞因子浓度为 50U/ml。
6. 第 10 天，在显微镜下观察 T 细胞克隆扩增情况。如果母细胞密度较高且培养基颜色变黄，用含细胞因子的扩增培养基将细胞进行 1∶2 传代。对于生长旺盛的细胞，可每隔 2～3d 进行细胞传代。

　　经过 2 周左右时间细胞可扩增约 1000 倍。在无追加刺激的情况下，细胞可继续培养几周。

参考文献：Porcelli and Modllin，1999；van der Vliet *et al.*，2001

撰 稿 人：Mark A. Exley，Steven P. Balk，and S. Brian Wilson

［徐红梅（第六章）］

第七章　抗原加工处理和呈递

T 淋巴细胞只能识别与 MHC 分子结合的蛋白多肽（又称多肽-MHC 复合物），多肽-MHC 复合物的形成与抗原加工处理（antigen processing）有关，抗原加工处理包括将抗原水解为短肽、短肽与 MHC 分子结合成多肽-MHC 复合物以及多肽-MHC 复合物在胞质内向细胞膜的转运进而在细胞膜表面表达等多个阶段。所谓抗原呈递（antigen presentation）指的是 T 细胞对抗原呈递细胞表面表达的多肽-MHC 复合物的识别过程。T 细胞识别抗原后会活化、增殖并分泌多种细胞因子。专职性抗原呈递细胞能有效活化 T 淋巴细胞，这些专职性抗原呈递细胞包括巨噬细胞、树突细胞以及 B 淋巴细胞，其他一些细胞也具有抗原呈递的功能。从实验的角度，某些 T 细胞杂交瘤细胞常用于检测多种细胞表面表达的多肽-MHC 复合物，因为这些 T 细胞杂交瘤细胞受到多肽-MHC 复合物刺激后能分泌白细胞介素 2（IL-2），IL-2 则可以通过 ELISA 法或通过依赖细胞株 CTLL-2 的方法检测。

MHC 分子包括 MHC Ⅰ类分子和 MHC Ⅱ类分子两类，这两类 MHC 分子拥有不同的结构和功能，与不同抗原的加工处理和呈递有关。一般情况下，外源性抗原通过 MHC Ⅱ类分子途径加工处理和呈递，内源性抗原则通过 MHC Ⅰ类分子途径加工处理和呈递，当然，也存在特殊的情况，即所谓的交叉呈递。

本章主要介绍研究 MHC Ⅱ类分子途径加工处理和呈递抗原的方法，也将附带讨论 MHC Ⅰ类分子途径加工处理和呈递抗原的某些相关问题。本书其他多个章节里也介绍了部分与抗原处理相关的某些操作方法，如制备抗原呈递细胞的过程，这些细胞包括腹腔巨噬细胞（单元 6.1）、骨髓来源的巨噬细胞（单元 6.1）、B 细胞（单元 2.1）、树突细胞（单元 2.3）。此外，某些转化的细胞株也常常用作抗原呈递细胞，如 B 淋巴瘤细胞样的 CH-27（$H-2^k$；Haughton *et al.*，1986）、TA3（$H-2^{k/d}$；Glimcher *et al.*，1983）、A20（$H-2^d$；ATCC）、M12（$H-2^d$；Glimcher *et al.*，1982）、LB27.4（$H-2^{b/d}$；ATCC）和 LK35.2（$H-2^k$；Kappler *et al.*，1982）。由于巨噬细胞功能多变，以其作为抗原呈递细胞开展研究时常常结果不一致，但在某些特定条件下使用巨噬细胞株如 RAW264.7 或巨噬细胞杂交瘤细胞等则效果很好。表达 MHC Ⅱ类分子的 L 细胞或 CHO 细胞（Lechler *et al.*，1985；McCoy *et al.*，1989）也常在研究中使用。其他一些章节还介绍了 T 细胞杂交瘤细胞的制备（单元 2.13）和检测（单元 2.11）以及检测 CTL 细胞毒功能的 ^{51}Cr 释放法（单元 2.10）等。

撰 稿 人：Clifford V. Harding

单元 7.1　抗原呈递细胞的选择和制备

注意：单核细胞增生性利斯特氏菌是人类致病菌，需要在防护良好的 BL-2 级实验

室操作。所有实验器材均需消毒，所有接触过利斯特氏菌的废弃物均需要经过特殊消毒处理。

注： 除非特别说明，所有培养均是在37℃，5%CO_2环境下进行。所有与活细胞接触的试剂和器皿均需消毒。

基本方案　通过利斯特氏菌刺激制备腹腔巨噬细胞

材料（带√项目见附录1）

单核细胞增多性利斯特氏菌
√无菌PBS
H-2相合小鼠（见表A.2A.1），包括正常和提前3周注射了利斯特氏菌的小鼠
√冰浴的DMEM培养基
3%（*V*/*V*）乙酸
0.4%（*m*/*V*）台盼蓝染液
√DMEM-10完全培养基（室温以及37℃）
70%（*V*/*V*）乙醇
10ml和30ml的注射器以及23G针头
离心机
96孔培养板
移液器
显微镜

1. 在50ml离心管内将利斯特氏菌用PBS稀释至合适浓度，此时0.5～1.0ml菌液中含半数致死量5%～10%的细菌（一般情况下CBA/J小鼠或C57BL/6小鼠需10^5个细菌/ml，BALB/c小鼠需10^4个细菌/ml）。盖紧离心管盖后摇匀。用10ml注射器抽取稀释过的上清。
2. 用23G针头将0.5～1.0ml细菌悬液注射入H-2相合小鼠腹腔。根据步骤6计算出制备足够用细胞所需小鼠数量。
3. 7～11d后收集腹腔细胞（单元6.1）。用冰浴的DMEM收集细胞以防止巨噬细胞黏附在管壁上。
4. 将收集的细胞悬液置于50ml离心管，4℃，400～500*g*离心10min，收集细胞并重悬于0.5ml预冷的DMEM中。
5. 吸取少量细胞悬液并以1∶5（*V*/*V*）悬浮于3%的乙酸溶液中，以溶解红细胞。加入等量的台盼蓝染液并计数活细胞（见附录3C，细胞数量应达到1×10^7～2×10^7个细胞/ml）。
6. 在离心管内加入DMEM-10完全培养基，将细胞浓度调节至2×10^6个细胞/ml。如果血清浓度达不到8%～9%，可离心细胞弃上清后直接用DMEM-10完全培养基稀释至2×10^6个细胞/ml。将腹腔细胞转移至96孔培养板培养，100μl/孔（2×10^5个细胞/孔）。
7. 37℃培养2h或稍长时间（但不可过夜）以便巨噬细胞贴壁。

8. 用多道移液器反复轻柔地吹打细胞，吸弃悬浮细胞后加入 37℃预热的 DMEM-10 完全培养基。注意操作宜轻柔且不能触碰到贴壁细胞。
9. 在显微镜下检查细胞。

分离的细胞若在 1d 内使用，就无需用 IFN-γ 进一步活化。

备选方案 1　连续注射利斯特氏菌和脲蛋白胨后制备腹腔巨噬细胞

此法可以较前法制备更多数量的小鼠腹腔巨噬细胞，但需要给小鼠多注射一次，且需要在更短的时间内收集巨噬细胞。此过程与前述基本方案基本相同，只是在初次注射细菌 7～10d 后，直接给小鼠腹腔一次性注射 1ml 高压灭菌消毒的溶解于水的 10%（*V*/*V*）脲蛋白胨。3d 后如前述收集细胞（见基本方案，步骤 3～9）。

辅助方案 1　小鼠腹腔注射用利斯特氏菌的制备

材料（带√项目见附录 1）

4 只小鼠（如 CBA/J）
培养单核细胞增生性利斯特氏菌（见单元 6.6）
√无菌 PBS
100mm 无菌脑心浸液琼脂板
无菌脑心浸液培养基
细菌冻存液：溶解于 PBS 的 20%（*V*/*V*）甘油，蒸汽消毒后 4℃保存
70μm 无菌尼龙滤网
50ml 离心管
无菌细菌涂布器
37℃培养箱
无菌接种环
560nm 分光光度计
高速离心机以及无菌带盖离心管
Sorvall RC-5 离心机及 GSA 转子
1ml 冻存管

1. 将适量利斯特氏菌注射至 2 只小鼠腹腔，以便通过体内途径获得利斯特氏菌并确保其毒力。如对于 CBA/J 小鼠，可使用 10^6 个细菌/鼠。2d 后处死小鼠，取出脾脏并制备脾细胞悬液，通过 70μm 无菌尼龙滤网后将细胞置于 50ml 离心管。另取 2 只小鼠作为对照。

也可以不通过体内传代，直接从脑心浸液琼脂板挑取利斯特氏菌克隆，参照步骤 3 接种至脑心浸液肉汤。

2. 用 PBS 梯度稀释脾细胞悬液（1∶10、1∶100、1∶1000）并将 100μl 各组稀释细胞悬液分别置于 100mm 无菌脑心浸液琼脂板，用无菌细菌涂布器将细胞涂布均匀。置于 37℃培养箱培养过夜。计数每块培养板的克隆数。确认涂布对照小鼠脾细胞板不形成克隆，且涂布实验小鼠脾细胞板形成大量克隆（对于 1∶100 稀释的细胞，每块

培养板应获得 10～100 个克隆）。

3. 用接种环从培养板挑取 4 个典型克隆并分别转移至 20ml 无菌脑心浸液培养基中（50ml 离心管）。注意每次挑取克隆时接种环均需灭菌。加盖混匀。

4a. 制备当天细菌培养物：将试管置 37℃培养，每 30min 摇动一次。3h 后，定时（比如每小时）取少量菌液通过分光光度计检测其 OD 值。当 OD 值均达到 0.17 时停止培养（约需 4h），从中取一管再扩增。

4b. 制备隔夜细菌培养物：将试管于 37℃静置培养过夜（试管盖无需盖紧）。第二天，将试管内的菌液以 1∶1000 稀释至无菌脑心浸液培养基，培养至 OD 值达到 0.5～1.0（约需 8h）。

5. 将菌液置 4℃保存（每份 0.5ml）。如方便，可于第二天确认培养物中是否含有利斯特氏菌。此外，利斯特氏菌能在 4℃存活并扩增。对于隔夜培养的细菌，进入步骤 7 操作。

表 7.1.1　内传代利斯特氏菌体的鉴定

方法	观察指标
革兰氏染色	利斯特氏菌为革兰氏染色阳性菌
血清学检测	玻片凝集试验：将含有利斯特氏菌的悬液与特异性血清混合，观察凝集情况
临床病原体检测	将样本送临床实验室对病原体进行鉴定

6. 经过筛选后，将含有细菌的 15～130ml 脑心浸液培养基转移至无菌高速离心管，将其固定在摇床的样品架上，在 37℃缓慢摇动培养，定时检测 OD_{560} 值，并在 OD_{560} 值达到 0.5～1.0 时停止培养（约需 5h）。

7. 7000*g* 离心细菌 6min。在此过程需非常小心：因为培养物里含有大量细菌。将细菌悬浮于 10ml 冻存液中。

8. 检测细菌的 OD_{560} 值（可通过 1∶20 稀释后检测），将细菌的浓度调节至 1×10^7～10^8 个细菌/ml（OD_{560} 值为 1 时细菌量约为 5×10^8）。将细菌分装（0.1～1ml）保存于－80℃，可以保存 3 年以上。每次解冻后使用，应避免反复冻融。

备选方案 2　Con A 刺激的腹腔巨噬细胞的制备

此方案中不使用致病菌，但巨噬细胞获得率较低。将 Con A 溶解于 PBS（200μl/ml），用 0.22μm 的滤器过滤，然后保存于－20℃。每只小鼠腹腔注射 500μl（100μg）Con A（附录 2E），4d 后收集腹腔巨噬细胞（见基本方案，步骤 3～9）。

备选方案 3　骨髓来源的巨噬细胞的制备

附加材料（其他材料见基本方案）：

10%（*V/V*）L929 细胞条件培养基（见辅助方案 2），溶解于 DMEM-10 完全培养基
0.05%（*V/V*）胰蛋白酶/0.53mmol/L EDTA
100U/ml（10ng/ml）重组小鼠 IFN-γ，溶解于 10% L929 条件培养基
5ml 注射器和 25G 针头

100mm 无菌培养皿
10ml 无菌吸管
70μm 无菌尼龙滤网
细胞培养皿和培养瓶（可选用）
96 孔平底培养板或 24 孔培养板或 100mm 细胞培养皿

1. 处死小鼠（附录 2G），取出股骨并去除肌肉（单元 6.1）。
2. 剪断股骨，通过 5ml 注射器和 25G 针头用 4ml 10% L929 条件培养基冲洗出骨髓，将骨髓收集至无菌 100mm 细胞培养皿。
3. 用 10ml 无菌吸管反复吹打细胞团块，将细胞悬液通过 70μm 无菌尼龙滤网。
4. 取部分细胞悬液以 1∶5 悬浮于 3%乙酸，以溶解红细胞。加入等量的 0.4%台盼蓝染液计数活细胞。据此用 10% L929 条件培养基调节细胞浓度至 10^6 个细胞/ml。

5a. 扩增细胞：将细胞置于培养皿或培养瓶中培养 7d，用 0.05%（V/V）胰蛋白酶/0.53mmol/L EDTA 消化，收集细胞并以 5×10^4～10^5 个细胞/孔置于 96 孔培养板中培养。

5b. 不扩增培养：将细胞置于培养板：
　　96 孔培养板：0.2ml 细胞悬液/孔
　　24 孔培养板：1ml 细胞悬液/孔
　　100mm 培养皿：12ml 细胞悬液/个

6. 对于扩增的细胞，继续培养 1～2d 直至细胞汇合。对于未扩增培养的细胞需培养 5～7d，用 10% L929 条件培养基每 2 天换液。
7. 为了增强抗原呈递效率，可在抗原呈递实验前 48h 用 100U/ml 溶解于 10% L929 条件培养基的重组小鼠 IFN-γ（10ng/ml）处理细胞。

辅助方案 2　制备 L929 条件培养基

材料（带√项目见附录 1）

　贴壁培养 L929 细胞（ATCC 细胞株号 CCL1）
√无菌 PBS，室温
　0.05%（V/V）胰蛋白酶/0.53mmol/L EDTA
√DMEM-10 完全培养基
　15ml 离心管
　Sorvall RT-6000 冷冻台式离心机及 HB-1000 转子
　培养瓶
　0.45μm 滤膜

1. 在 $25cm^2$ 培养瓶中培养 L929 细胞，当细胞处于对数生长期并汇合生长时吸弃上清（10ml）。加入 3ml 室温无菌 PBS，摇动培养瓶后静置 1min，轻轻摇动一次后吸弃 PBS。
2. 加入 3ml 0.05%（V/V）胰蛋白酶/0.53mmol/L EDTA 静置 5min。盖紧瓶盖，拍打培养瓶使细胞脱落，也可在显微镜下观察细胞脱落情况。

3. 加入 10ml DMEM-10 完全培养基并将细胞悬液转移至 15ml 离心管，4℃，400～500*g* 离心 10min，吸弃上清后，将细胞悬浮于和原培养基等量的 DMEM-10 完全培养基中。
4. 将细胞悬液用 DMEM-10 完全培养基作 1∶10（*V*/*V*）稀释并转移至适当大小的培养瓶中（0.4ml 细胞悬液/cm^2 培养瓶）。继续 37℃培养直至细胞汇合，一般需要一周。
5. 收集细胞上清，用 0.45μm 滤膜过滤并分装成每份 1～15ml，置－20℃冻存。

备选方案 4　制备 LPS 刺激的 B 细胞

材料（带√项目见附录 1）

悬浮于 DMEM-10 完全培养基中的脾脏细胞悬液（单元 2.1）
√DMEM-10 完全培养基，37℃
LPS（如 Difco 或 Sigma）
100mm 细胞培养皿
50ml 无菌离心管
Sorvall RT-6000 冷冻台式离心机及 HB-1000 转子
75cm^2 细胞培养瓶

1. 用 ACK 红细胞裂解液（单元 2.1）去除脾细胞悬液中的红细胞。
2. 将细胞悬浮于 DMEM-10 完全培养基，计数活细胞（附录 3C），调节细胞浓度至 5×10^6 个细胞/ml。
3. 将细胞转移至 100mm 细胞培养皿（10ml/培养皿）中，并在 37℃培养 2h，轻轻摇动培养瓶后，将悬浮细胞转移至 50ml 离心管。
4. 室温，200～300*g* 离心 10min，吸弃上清，将细胞再次悬浮于预热的 DMEM-10 完全培养基，计数细胞（附录 3C），调节细胞浓度至 2×10^6 个细胞/ml。
5. 加入 LPS 至终浓度 10μg/ml。将细胞悬液转移至 75cm^2 细胞培养瓶或 100mm 细胞培养皿，37℃培养 48h。
6. 轻轻摇动培养瓶使非贴壁细胞悬浮，将细胞悬液转移至 50ml 离心管，200～300*g* 离心 10min，吸弃上清，将细胞再次悬浮于 DMEM-10 完全培养基。
7. 200～300*g* 离心 10min，吸弃上清，将细胞再次悬浮于预热的 DMEM-10 完全培养基，计数细胞，调节细胞浓度至 2×10^6 个细胞/ml。这些细胞就可用作非贴壁的抗原呈递细胞（单元 7.2）。

撰稿人：Clifford V. Harding

单元 7.2　外源性抗原向 T 细胞的呈递

表 7.2.1 介绍了几种可以用于实验研究的抑制剂，本章末附了常见问题指南（表 7.2.2）。

表 7.2.1　常用抑制剂对抗原加工处理的影响

抑制剂	抑制浓度	机制	对 MHC I 类途径的影响	对 MHC II 类途径的影响
绿喹	0.1mmol/L	破坏胞内 pH 梯度及细胞内吞功能	无作用或作用轻微	强烈抑制
布雷非德菌素 A[a]	1μg/ml（0.5～5μg/ml）	阻断内质网和高尔基体的转运	快速阻断	长时间作用时，通过抑制 MHC II 类分子的转运发挥抑制作用
蛋白质合成抑制剂[b]	合适浓度	阻断蛋白合成	快速阻断	长时间作用时，通过抑制 MHC II 类分子的转运发挥抑制作用
细胞松弛素 D[c]	5～10μg/ml	阻断肌动蛋白介导的吞噬	无作用	阻断颗粒性抗原的处理，对可溶性蛋白抗原无效[d]
蛋白酶体抑制剂[e]	合适浓度	抑制蛋白酶体活性	抑制	无效（不排除对滤泡蛋白酶的非特异抑制作用）
滤泡蛋白酶抑制剂[f]	合适浓度	抑制滤泡蛋白酶	无作用	抑制

a. 布雷非德菌素 A，1～2mg/ml 储存液，100％乙醇配制，－20℃保存。

b. cycloheximide，1～10mg/ml 储存液，DMEM 配制，工作浓度 10μg/ml，临用前稀释保存。

c. 细胞松弛素 D，2mg/ml 储存液，DMSO 配制，－20℃保存。

d. 作者未发表的实验结果。

e. 可用 DMSO 配制储存液。

f. PMSF，0.2mol/L 储存液，100％乙醇配制，－20℃保存，工作浓度 0.2mmol/L。

注意：除非特别说明，所有培养均是在 37℃，5％CO_2环境下进行。所有用于与活细胞接触的试剂和器皿均需消毒。

基本方案　一种抗原加工处理和呈递的检测体系

对于颗粒性抗原或脂质体包裹的抗原，应用巨噬细胞作为抗原呈递细胞。

材料（带√项目见附录 1）

具有增殖能力的（如转化的 B 细胞）或非增殖的且与 T 杂交瘤细胞 MHC 匹配的抗原呈递细胞（单元 7.1）

√DMEM-10 完全培养基，37℃

对数生长期的 T 杂交瘤细胞

抗原：溶解于水的蛋白质或多肽（对于难溶于水的多肽，需要用 DMSO 溶解且需设置溶剂对照）

IL-2 ELISA 试剂盒（如 Genzyme）或见单元 5.1

96 孔平底培养板

Sorvall RT-6000 冷冻台式离心机及 HB-1000 转子

0.22μm 低蛋白结合性滤膜，仅用于多肽过滤

多道移液器及无菌枪头

1a. 对于非增殖的抗原呈递细胞：将分离的腹腔细胞或其他非增殖或低增殖的细胞加入 96 孔平底培养板，2×10^5 个细胞/孔，用 DMEM-10 完全培养基将液体量调节为

100μl/孔。

1b. 对于具有增殖能力的细胞株：用 DMEM-10 完全培养基制备 B 细胞悬液（5×10^5 个细胞/ml），将细胞加入 96 孔平底培养板，100μl/孔（5×10^4 个细胞/ml）。

2. 室温，400～500g 离心收集处于对数生长期的 T 杂交瘤细胞（$5\times10^5\sim10^6$ 个细胞/ml），将细胞悬浮于预热的 DMEM-10 完全培养基，计数细胞（附录 3A），将细胞浓度调节至 2×10^6 个细胞/ml。加入 50μl/孔（10^5 个细胞/孔）至含有抗原呈递细胞的 96 孔平底培养板，置于 37℃培养或立即进行步骤 3 操作。

3. 制备 1mmol/L 蛋白质或多肽储存原液。将合成的多肽溶解于去离子水中，用 0.22μm 低蛋白结合性滤膜过滤（可储存于 4℃数月）。对于蛋白抗原，可于使用前溶解于 DMEM-10 完全培养基。

4. 用 DMEM-10 完全培养基作连续梯度稀释抗原，可根据浓度需要设计稀释的梯度，抗原浓度需要大于终浓度的 4 倍以上。

5. 将 50μl/孔抗原加入到含有抗原呈递细胞和 T 杂交瘤细胞的 96 孔平底培养板。每个抗原浓度设三个复孔，以及一系列空白对照孔（加入 50μl/孔 DMEM-10 完全培养基）。继续置 37℃培养 20～24h。

　　抗原、抗原呈递细胞和 T 杂交瘤细胞可按照任意次序加入。

6. 400～500g 离心培养板 10min。用多道移液器将 100μl/孔上清转移至一新的圆底 96 孔板。将原培养板－20℃保存以便在 IL-2 检测出现问题时备用。

7. －80℃冻存 1h 或－20℃冻存过夜以便灭活混入上清的活细胞（培养板可冻存于－20℃数周后使用）。检测上清中 IL-2 的水平（单元 5.1）。

备选方案 1　用固定后的贴壁型抗原呈递细胞检测加工处理过的抗原肽

此方案可用于检测 MHC I 类分子途径或 MHC II 类分子途径呈递给 T 杂交瘤细胞的抗原肽。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

√DMEM 培养基（无血清）

√溶解于 PBS 的 2%（m/V）多聚甲醛溶液

√赖氨酸洗液

1a. 对于贴壁的腹腔巨噬细胞：将分离的腹腔巨噬细胞以 2×10^5 个细胞/孔加入到 96 孔平底培养板，用 DMEM-10 完全培养基将液体总量调节至 100μl/孔。37℃培养 2h 使细胞贴壁。

1b. 其他贴壁的抗原呈递细胞：将细胞以 2×10^5 个细胞/孔加入到 96 孔平底培养板，用 DMEM-10 完全培养基将液体总量调节至 100μl/孔。37℃培养足够的时间使细胞贴壁。对于需要过夜培养以贴壁的细胞株，细胞浓度需低 2～4 倍以便细胞增殖。

2. 用多道移液器吹打悬浮细胞，一次吸弃一排或多排培养板孔的上清并立即加入无血清 DMEM 100μl/孔。其余的细胞同法处理。

3. 将 2%多聚甲醛溶液与无血清 DMEM 等量稀释（多聚甲醛浓度为 1%），立即进入步骤 4 操作。

如果在后续步骤中出现固定液毒性问题，可将多聚甲醛以0.5%稀释于DMEM。

4. 将培养板中细胞培养液替换为固定液（100μl/孔）。室温孵育10～15min。
5. 用多道移液器吸弃固定液，加入120μl/孔DMEM，为了防止固定液残留，移液器头应避免接触孔壁且避免溅出。吸弃DMEM并加入赖氨酸洗液（120μl/孔）。室温孵育20～30min。
6. 用DMEM洗板4次（DMEM用量应逐渐加大，如前面两遍可加入150μl/孔，后两遍可用180μl/孔）以去除多聚甲醛。洗板结束后每孔加入100μl DMEM-10完全培养基。
7. 将固定的细胞和杂交瘤细胞以及抗原共培养（见基本方案，步骤2～5）。培养过夜后，检查培养板内T细胞的活力（残留的固定液可能导致T细胞死亡）。
8. 收集上清检测IL-2水平（见基本方案步骤6～7）。

备选方案2　用固定后的非贴壁型抗原呈递细胞检测加工处理过的抗原肽

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录1）

转化的B细胞或其他非贴壁型细胞用作抗原呈递细胞。

√DMEM培养基（无血清）

√2%（*m*/*V*）多聚甲醛溶液，溶解于PBS

√赖氨酸洗液

15ml以及50ml无菌离心管

1. 收集处于对数生长期的小鼠B淋巴瘤细胞，400～500*g*，室温，离心10min。将细胞悬浮于无血清DMEM（5×10^6个细胞/ml）。
2. 加入等量2%多聚甲醛溶液，室温孵育5～10min，400～500*g*，室温，离心10min，弃上清后将细胞悬浮于DMEM中（液体量应大于或等于固定液的量），再次400～500*g*，室温，离心10min。
3. 将细胞悬浮于赖氨酸洗液中，室温孵育20～30min。离心弃上清后，将细胞用DMEM洗2遍。
4. 细胞悬浮于DMEM完全培养基中（2×10^6个细胞/ml），将细胞加入96孔平底培养板（2×10^5个细胞/孔）。
5. 将固定的细胞和杂交瘤细胞以及抗原共培养（见基本方案，步骤2～5）。培养过夜后，检查培养板内T细胞的活力（残留的固定液会导致部分T细胞死亡）。
6. 收集上清检测IL-2水平（见基本方案，步骤6～7）。

备选方案3　蛋白抗原致敏的细胞固定后检测抗原加工和处理

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录1）

√2%（*m*/*V*）多聚甲醛溶液，溶解于PBS

√赖氨酸洗液

1. 将抗原呈递细胞（如分离的腹腔巨噬细胞）以2×10^5个细胞/孔加入到96孔平底培养板，培养使之贴壁（如巨噬细胞需37℃培养2h）。吹打上清后将上清替换为DMEM-10完全培养基（100μl/孔）。

2. 用 DMEM-10 完全培养基连续梯度稀释抗原，抗原浓度需大于工作浓度的 2 倍。将稀释的抗原加入铺有抗原呈递细胞的培养板（100μl/孔），包括两排无抗原对照孔（见步骤 7）。37℃培养一段时间（如对于活化的腹腔巨噬细胞，需培养 2h）。
3. 培养结束前，将等量的无血清 DMEM 和 2%多聚甲醛溶液混合（多聚甲醛浓度为 1%），立即进入下一步操作。

   后续操作中如存在固定液的毒性问题，可考虑使用低浓度的多聚甲醛溶液（如 0.5%）。
4. 吸弃培养上清，用 DMEM（200μl/孔）洗涤细胞一次，加入固定液（100μl/孔），室温固定 10～15min。
5. 用多道移液器吸弃固定液，加入 120μl/孔 DMEM，为了防止固定液残留，枪头避免接触孔壁且避免固定液溅出。吸弃 DMEM 并加入赖氨酸洗液（120μl/孔）。室温孵育 20～30min。
6. 用 DMEM 洗板 4 次（所用 DMEM 的量应逐渐加大，如前面两遍可加入 150μl/孔，后两遍可用 180μl/孔）以去除残余的多聚甲醛。洗板结束后每孔加入 100μl DMEM-10 完全培养基。
7. 将 T 细胞杂交瘤细胞悬浮于 DMEM 完全培养基中（10^6 个细胞/ml）。加入细胞培养板（10^5 个细胞/孔）。在一排对照孔内（未加抗原）加入 20μl/孔的免疫原性肽作为阳性检测孔，其终浓度应为工作浓度的 10 倍（此时培养孔总体积为 220μl，但并不影响实验结果）。37℃培养 20～24h。
8. 收集上清检测 IL-2 水平（见基本方案，步骤 6～7）。

表 7.2.2 抗原加工处理检测实验问题解答

问题	原因	分析	解决方法
T 细胞无反应	IL-2 检测失败	检验 ELISA 和 CTLL-2 依赖法阳性及阴性对照组	确保 IL-2 检测方法无误（如重新复苏 CTLL-2 细胞）
	T 细胞无反应	用基本方案检测同一 T 细胞对不同抗原（不同浓度的蛋白或多肽抗原）及不同 APC 的反应；也可与其他 T 细胞比较	重新复苏 T 细胞
	制备的抗原无效	尝试用不同的抗原（蛋白或多肽），以及对同一抗原具有特异性的其他 T 细胞	更换抗原
	APC 失活或与 MHC 分子不匹配	尝试用其他抗原以及匹配的 T 细胞检测；可用流式细胞分析 MHC 分子的表达	复苏新的 APC 或调整 APC 激活方案（单元 7.1）
复孔误差过大	T 细胞培养时固定液的细胞毒性	在显微镜下检测 T 细胞并检测培养基的酸碱度	固定后加强洗板
	将细胞转移至培养板时不均匀	检查移液技术	确认混匀所有细胞

缩写：APC，抗原呈递细胞；IL-2，白细胞介素 2；MHC，主要组织相容性复合体。

撰稿人：Clifford V. Harding

[于益芝（第七章）]

第八章 人类免疫学研究

对人类免疫系统的研究有助于了解和控制各种自身免疫疾病和肿瘤，这些疾病直接或间接影响了免疫应答。本章所介绍的方法为研究免疫功能正常的个体和患有先天性或获得性免疫性疾病的患者提供了有效的途径。

本章介绍了从外周血或淋巴组织中分离特定细胞的基本步骤。开篇介绍了依据细胞密度分离全部单核细胞的方法（聚蔗糖-泛影葡胺梯度离心；单元 8.1），之后相继介绍了如何从单个核细胞中分离主要的细胞类型（T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞）（单元 8.2～8.6）。后面还介绍了原位分离和纯化各种免疫细胞的方法（单元 8.17）；并囊括了分离肠黏膜组织以获得大量高纯度的具有活力的肠黏膜单个核细胞的方法。单元 8.18 介绍了从外周血中分离抗原呈递细胞即树突细胞的方法。单元 8.19 对依据表面标志定义自然杀伤细胞提供了分离方法。本章对应用流式细胞仪检测未分离的淋巴细胞也做了阐述（单元 8.7）。

这里介绍的活化多克隆 T 细胞活化的方法包括用多种不同丝裂原刺激 T 细胞增殖的技术的研究（单元 8.8）。除此之外，这些方法可以用于评估 T 细胞对 B 细胞的调节作用（单元 8.9）。本章还介绍了在 CD3 抗体活化的多克隆系统中评价细胞毒 T 细胞功能的方法（单元 8.13）。最后阐述了通过体内给予抗原刺激后检测血清中抗体合成水平来评估机体对抗原的反应的过程（单元 8.12）。提供各种免疫球蛋白检测方法，包括 ELISA 和 ELISPOT 等检测各种免疫球蛋白的方法（单元 8.10 和 8.11）。同时也涉及了评价 NK 细胞和 LAK 细胞杀伤活性的技术。

另一部分方案涉及长寿和永生的淋巴细胞系以及克隆的诱导和培养。单元 8.15 讲述了从纯化的外周血或脐带血分离的 $CD4^+$ T 细胞中获得产生不同细胞因子的不同抗原特异性 T 细胞系及 T 细胞亚型的方案。本章也提出了诱导长寿 B 细胞系的方法，即 Epstein-Barr 病毒（EBV，单元 8.16 ）转化 B 细胞。

对人类免疫系统的免疫学研究提出了可能引起人类疾病感染的危险性相伴随的特殊安全问题。近年来 AIDS（HIV-1）病毒的感染引起了广泛的关注，然而也必须注意到，研究材料中可能潜伏的其他危险病原体，包括乙型肝炎病毒（HBV）、巨细胞病毒、EBV 及一系列细菌病原。本章中所有方法都需要按照安全规定操作人体血液、细胞或者感染性试剂等。前言中可以查阅到关于生物安全等级操作的内容。

撰 稿 人：Warren Strober

单元 8.1 外周血和脐带血中分离单个核细胞

注： 若无特别声明，本章所有培养过程均在 37℃，5%CO_2 培养箱中进行。所有试剂及接触活细胞的器械必须无菌。

基本方案　Ficoll-Hypaque 梯度离心法分离单个核细胞

材料（带√项目见附录 1）

肝素抗凝血（附录 3G）或者肝素化的脐带血（10ml 脐带血加入 1ml 含 250U 的 PBS 为宜）
√PBS
√聚蔗糖-泛影葡胺（Ficoll-Hypaque）溶液
√HBSS
FBS（Hyclone），加热灭活（56℃，1h）或者不加热均可
√RPMI-10 完全培养基
15ml 或 50ml 圆锥底的离心管
Beckman GPR GH-3.7 水平转头离心机（或者等效设备），18～20℃

1. 检查肝素化的抗凝血，清除细小的血凝块。将新鲜无血凝块的肝素化抗凝血置于 15ml 或者 50ml 离心管中，用无菌移液管加入等量室温的 PBS。对于浓缩白细胞样品，其与 PBS 以 1∶4 比例稀释、混匀。
2. 倾斜 45°角持离心管，用移液管吸取聚蔗糖-泛影葡胺溶液（每 10ml 血样/PBS 混合液加入 3ml 聚蔗糖-泛影葡胺溶液），伸入样品管底部，缓缓将聚蔗糖-泛影葡胺溶液加入血样/PBS 混合液底部。18～20℃，900g 持续离心 30min。
3. 用无菌移液管将含血浆和大部分血小板的最上层弃去（图 8.1.1），用另一移液管将其下层的单个核细胞移入新的离心管。加入过量的 HBSS（达到细胞层 3 倍体积的量）洗细胞，18～20℃，400g 离心 10min，弃上清。重复洗细胞以除去大部分血小板。

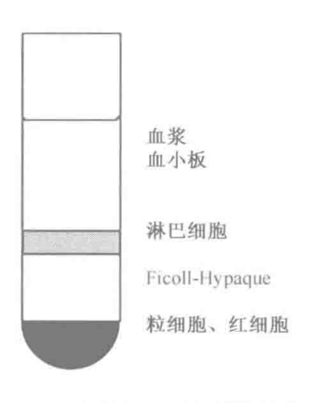


图 8.1.1　聚蔗糖-泛影葡胺梯度离心分离血液成分。

4. 用 RPMI-10 完全培养基重悬单个核细胞。计数细胞（附录 3A），并用台盼蓝标记排除死细胞（附录 3C）。
5. 若样品为脐带血或婴儿血，为了获得纯的单个核细胞，可重复聚蔗糖-泛影葡胺梯度离心以避免红细胞及其前体的污染。
6. 如果需要，可用流式细胞仪检测 PBMC 纯度（单元 4.2）。

辅助方案　贴壁法去除单个核细胞中的单核细胞和巨噬细胞

基本方案得到的单个核细胞中几乎 40%为单核细胞和巨噬细胞。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

单个核细胞悬液（见基本方案）
√RPMI-20，完全培养基

150cm^{2}斜颈组织培养瓶

1. 18～20℃，300*g* 离心单个核细胞 10min，弃上清，室温下用 RPMI-20 完全培养基重悬沉淀，调整细胞浓度至 2×10^6 个细胞/ml。将 50ml 细胞悬液移入 150cm^{2}组织培养瓶，水平放置于 37℃，5%CO_2培养箱中孵育 1h。
2. 将非贴壁的淋巴细胞缓缓倒入离心管，用 37℃的 RPMI-10 完全培养基轻轻冲洗组织培养瓶，洗液也加入离心管中。
3. 重复步骤 1 和 2。再次离心细胞，弃上清，重悬沉淀于 5～10ml RPMI-10 完全培养基中。计数单个核细胞（附录 3A），并用台盼蓝排除法检测细胞活力（通常活细胞>90%，附录 3C）。如果需要，可以从组织培养瓶中回收贴壁细胞（单核细胞和巨噬细胞），见单元 8.5 。
4. 如果需要，可用流式细胞仪检测 PBMC 纯度（单元 4.2）。

参考文献：Boyum，1968；Niku *et al*.，1987；Thiele *et al*.，1983

撰 稿 人：Marjorie E. Kanof，Phillip D. Smith

单元 8.2　T 细胞亚群的分离纯化

注：所有试剂及接触活细胞的器械必须无菌。

基本方案　间接淘洗法分离 T 细胞亚群

分离出来的 T 细胞用抗 CD8 抗体可分为 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞。由于两种细胞都可回收，此法优于抗体和补体溶解法（见备选方案）。

材料（带√项目见附录 1）

亲和纯化的人免疫球蛋白吸附的羊抗鼠 Ig（Tago）
0.05mol/L Tris · Cl，pH9.5
抗 CD 8 抗体或其他特异性小鼠抗体（多克隆或单克隆；如 Coulter 或 Becton Dickinson）
√PBS
总 T 细胞（见辅助方案 1 或 2）
含 5%和 1%（*V/V*）热灭活 FCS（56℃，1h）的 PBS
√RPMI 完全培养基（无血清，经过滤保持无菌）
15mm×100mm 塑料培养皿，细菌学级别（非组织培养用）
15ml 离心管
Beckman GPR GH-3.7 水平转头离心机（或者其他同类产品），4～10℃
4℃的台式摇床
倒置显微镜
无菌细胞刮

1. 用 pH9.5 的 0.05mol/L Tris · Cl 稀释羊抗鼠 Ig 至 10μg/ml，取 10ml 加入 15mm×100mm 培养皿，轻轻晃动使之覆盖平皿底面，室温孵育 40min，或者 4℃孵育 24h。

如果需要，平皿可置于4℃保存1～2周。

2. 确定标记单个核细胞所需的特异性小鼠来源抗体的浓度（本方案中为抗CD8抗体），并用PBS稀释至此浓度，用于流式细胞仪检测（单元4.1）。
3. 将2×10^7～3×10^7个T细胞加入离心管，4～10℃，400g离心10min。弃上清，重悬细胞、加适量抗体（步骤2）。冰浴30min。
4. 孵育T细胞的同时，用无菌移液管吸去培养皿中未结合的羊抗鼠Ig（若要回收未结合Ig，立即将其转入另一培养皿，重复晃动使覆盖平皿底和孵育步骤）。取5～7ml含5% FCS的PBS加入培养皿，轻轻晃动，吸去上清。重复3次。
5. 将5～10ml 5%FCS加入T细胞，离心，方法同上，弃上清。重复洗1次。
6. 用3ml 5%FCS重悬T细胞。用无菌移液管吸去培养皿中5%FCS，立即将T细胞加入培养皿中，在4℃台式摇床上孵育30min。轻轻晃动培养皿30s，继续4℃孵育30min。
7. 轻轻将上层液体吸出，收集保存未贴壁的细胞。用移液管尖端沿培养皿侧壁加入5～7ml含1%FCS的PBS冲洗培养皿，弃上清，重复洗3次。如果需要高得率，也可将几次洗液加入未结合细胞液中（若要保证未结合细胞的纯度，则只保留首次吸出的液体）。
8. 倒置显微镜下观察培养皿，确定未结合细胞的数量，继续冲洗培养皿直至所有的未结合细胞全部吸出。
9. 将5～7ml 1%FCS加入培养皿，用无菌细胞刮刮取贴壁的细胞，重复2或3次。也可加入15ml 1%FCS，剧烈吹打以取出贴壁的细胞。观察培养皿以确定所有结合细胞全部被吸出。
10. 分别离心贴壁细胞和未贴壁细胞，方法同上，用无血清的RPMI完全培养基重悬细胞。取出等量的细胞悬液，用流式细胞仪检测纯度。
11. 若需提高细胞纯度，重复步骤6～10。

备选方案　抗体依赖补体介导的细胞毒作用分离T细胞亚群

T细胞中某一亚群可以通过与特定抗体结合而被去除，本方案使用的是抗CD4抗体。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录1）

新生家兔补体（Cedarlane实验室），禁止反复冻融

√RPMI-1完全培养基

抗CD4抗体或者其他特异性小鼠抗体（多克隆或单克隆抗体；必须是补体结合的IgG2a或IgM；如Coulter或Becton Dickinson）

1. 检测新生家兔补体对人单个核细胞非特异毒性的情况。确定能够产生最大抗体介导的细胞毒性和最小非特异细胞毒性（如不加入特异性抗体时细胞溶解）所需的补体的浓度（通常为20%～50%）。
2. 确定标记单个核细胞所需抗体量，用于流式细胞仪检测。
3. 将10^6～10^7个T细胞加入离心管，18～20℃，400g离心10min。弃上清，重悬细胞

沉淀、加适量抗体（步骤 2）。设置对照，包括与抗体共孵育但不加补体的细胞（步骤 4）、与补体共孵育但不加抗体的细胞，以及用 RPMI-10 完全培养基重悬不加入抗体及补体的细胞。冰浴 30min。离心，方法同上，弃去上清。

4. 用 RPMI-1 完全培养基稀释抗体至适宜浓度（步骤 1）。立即用此抗体稀释液重悬细胞，使细胞终浓度为 1×10^{7} 个细胞/ml。37℃水浴孵育 1h。如果需要，取出部分细胞以检测细胞毒的效率。若必要可重复与抗体和补体的孵育过程。
5. 在细胞中加入 10ml RPMI-1 完全培养基，离心，方法同上，弃上清，用 RPMI-1 完全培养基重悬细胞沉淀。重复 2 次，用 RPMI-1 完全培养基重悬最终的细胞。计数细胞（附录 3A），并检测细胞活力（附录 3C）和细胞毒百分率。

$$\text{细胞毒百分比}\% = 100\times\text{死亡细胞数}/(\text{活细胞数}+\text{死细胞数})$$

6. 聚蔗糖-泛影葡胺梯度离心去除死细胞（单元 8.1）。收集聚蔗糖-泛影葡胺层上方的活细胞层（死细胞沉于管底）。

辅助方案 1　应用神经氨酸酶处理的绵羊红细胞玫瑰花环形成法分离 T 细胞

材料（带√项目见附录 1）

悬于 Alsever 溶液中的绵羊红细胞（SRBC；Colorado Serum）（附录 1）
√HBSS
1U/ml 神经氨酸酶（低压冻干的粉末，X 型；Sigma）溶于 PBS（附录 1）；1ml 分装保存于－20℃
√RPMI-10 完全培养基
溶于 RPMI-10 完全培养基中的 PBMC（1×10^{7} 个细胞/ml；单元 8.1）
胎牛血清（FCS；56℃热灭活 1h）
√聚蔗糖-泛影葡胺溶液
√ACK 裂解液（可选用）
Beckman GPR GH-3.7 水平转头离心机（或者其他同类设备）
15ml 和 50ml 圆锥底的离心管（如 Falcon）
15ml 圆底离心管（如 Falcon）

1. 在 50ml 离心管中加入 15～25ml 悬浮于 Alsever 溶液中的绵羊红细胞（SRBC），再加满 HBSS，18～20℃，1000*g* 离心 10min。弃上清，用 HBSS 重悬细胞，再次离心，并重复洗一次。保存洗过的 SRBC 2～3d。
2. 将 1ml SRBC 混悬液加入 50ml 离心管，并加入 1ml 溶于 PBS 的 1U/ml 神经氨酸酶，用移液管吹匀细胞，37℃水浴孵育 1h。
3. 加满 HBSS，用上述方法离心，弃上清，重复洗 2 次。加入 49ml RPMI-10 完全培养基重悬细胞（SRBC 终浓度为 2%，*V/V*）。4℃保存直至使用（5～7d）。
4. 将 $\leqslant 2\times10^{7}$ PBMC 加入 15ml 圆底离心管，18～20℃，400*g* 离心 10min。弃上清，RPMI-10 重悬细胞使其浓度为 1×10^{7} 个细胞/ml。
5. 每 1×10^{7} 个细胞/ml PBMC 加入 2ml 热灭活的 FCS 和 2ml 神经氨酸酶处理过的 SRBC，37℃水浴孵育 1h。4℃，200*g* 离心 5min。冰上孵育 1h（无需弃上清）。

6. 每 10ml PBMC/FCS/SRBC 混合液加 3ml 聚蔗糖-泛影葡胺溶液至 15ml 离心管中，轻微倾斜离心管并以手掌反复搓动以重悬 PBMC/FCS/SRBC 混合液，并慢慢使其分层于聚蔗糖-泛影葡胺溶液上方（单元 8.1）。4℃，900*g* 离心 35min。
7. 用移液管吸去约 3/4 上清（培养基）。将界面层（未形成 E-玫瑰花环的细胞群，含 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞等）移入 15ml 锥底离心管，加满 HBSS，18～20℃，400*g* 离心 10min。弃上清，重悬细胞于 HBSS 中，重复洗涤。

   大致来说，未形成 E-玫瑰花环的细胞中有 10%可能为 T 细胞，重复洗 1 次能够减低至 2%以下。
8. 在不破坏 T 细胞/SRBC 细胞沉淀的基础上吸去残留的聚蔗糖-泛影葡胺溶液。为了从 SRBC 中分离与之结合形成 E-玫瑰花环的细胞（主要是 T 细胞），加入 1ml 无菌蒸馏水，重悬细胞沉淀并混匀 3 或 4 次，每次约 5s。当溶液变得透明时，立即转移至含 45ml RPMI-10 完全培养基的 50ml 离心管中。也可在细胞沉淀中加入 1ml ACK 裂解液，混匀，当溶液变得透明时（1～2min），加满 RPMI-10 完全培养基。
9. 18～20℃，400*g* 离心 10min，弃上清，重悬细胞于 HBSS 中，重复洗涤。RPMI-10 完全培养基重悬细胞沉淀（分离出的 T 细胞）。

辅助方案 2　应用 AET 处理的绵羊红细胞玫瑰花环形成法分离 T 细胞

附加材料（其他材料见辅助方案 1，带√项目见附录 1）

√AET 溶液

√PBS

1. 在 50ml 离心管中加入 8ml AET 溶液和 2ml 洗涤过的 SRBC（见辅助方案 1，步骤 1）。37℃水浴 20min。如果悬液颜色不变深，检查所有试剂的 pH 并重新开始。
2. 在离心管中加满冷 PBS，18～20℃，400*g* 离心 10min，弃上清。用 PBS 重悬细胞，重复洗 2 次。细胞沉淀（约 2ml）中加入 48ml RPMI-10 完全培养基，4℃保存（SRBC 终浓度为 4%，*V/V*）。
3. 在 15ml 圆底离心管中加入≤4×10^7单个核细胞，18～20℃，400*g* 离心 10min，弃上清，用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞使其浓度为 1×10^7 个细胞/ml。
4. 加入 2ml 热灭活的 FCS 和 4ml 4%AET 处理过的 SRBC，4℃，200*g* 离心 5min，冰浴 1h。分离未形成 E-玫瑰花环和形成 E-玫瑰花环的细胞（见辅助方案 1，步骤 6～9）。

参考文献：Mage *et al.*，1977；Payne *et al.*，1981；Wysocki and Sato，1978

撰 稿 人：Marjorie E. Kanof

单元 8.3　免疫磁珠法纯化 T 细胞

基本方案

本法用混合抗体阴性选择，去除所有非 T 细胞（B 细胞、巨噬细胞、自然杀伤细

胞等)。少量或大量细胞（10^6～10^{10}个细胞）均可用本法筛选。脾脏、淋巴结、肿瘤及腹水来源的细胞均适用。

注：所有试剂及接触活细胞的器械必须无菌。所有操作需要低温无菌环境。

材料（带√项目见附录1）

无防腐剂的合适单克隆抗体（腹水、纯化的蛋白质或者培养上清；IgG为佳；表8.3.1）（如果含防腐剂，需透析去除）

表 8.3.1　去除各种细胞所用抗体示例

细胞类型	受体	单克隆抗体和来源
单个核细胞	CD14	MMA（ATCC）
		My4（Coulter）
		Leu-M3（Becton Dickinson）
		63D3（ATCC）
	CD11b[a]	LM2/1（ATCC）
		M1/70（ATCC）
NK	CD16	Leu-11（Becton Dickinson）
RBC	抗 glycophorin	10F7（ATCC）
B细胞	CD20	B1（Coulter）
		Leu-16（Becton Dickinson）
CD8	CD8	OKT8（Ortho）
		Leu-2（Becton Dickinson）

a. 可选，取决于所期望的精确细胞群。

聚蔗糖-泛影葡胺分离的外周血单个核细胞（PBMC）（单元8.1）

√包被液，4℃储存，新鲜配置

羊抗小鼠IgG偶联的磁珠（Dynabeads M-450；Dynal）

15ml聚丙烯试管（如Falcon）

4℃摇床

H-1000B转头Sorvall RT6000离心机（或者同类设备），4℃

磁性分离装置（Dynal MPCI或Advanced Magnetic）

1. 选择合适的阴性选择分离T细胞的混合单克隆抗体（表8.3.1）。预实验中对PBMC进行流式细胞分析（单元4.2和8.7），确定每一种单克隆抗体的饱和浓度（通常每10^6个细胞需要$1\mu g/ml$）。根据这一数据，准备10×的混合单克隆抗体。如果需要，混合抗体可在无菌条件下4℃保存数月之久。
2. 用包被液重悬PBMC于15ml聚丙烯试管中，浓度为2×10^7个细胞/ml。所有细胞孵育过程都在此浓度下进行。
3. 加1ml 10×混合抗体到10ml细胞悬液中，在摇床上以6～10r/min转速，4℃孵育30min。
4. H-1000B转头Sorvall离心机4℃，150g离心10min。加满冷的新鲜配制的包被液重悬沉淀，重复洗涤，然后加包被液至10ml，重悬细胞，转移入新管。
5. 剧烈吹打原瓶中的抗IgG包被的磁珠悬液，取1ml磁珠加入15ml聚丙烯试管中预备

洗涤。加入包被液，振荡，用磁性装置将磁珠吸引至管壁。等待约5min使磁珠聚集至贴近磁铁处，将注射器尖端置于管底吸出包被液。重复洗涤。

6. 用1ml包被液重悬磁珠并加入细胞悬液，用6～10r/min转速，4℃孵育1h（这一转速能够充分混合细胞和磁珠而不致破坏细胞）。可以取部分细胞在显微镜下观察以确定磁珠围绕于某些细胞周围，而不存在于另一些细胞周围。
7. 用磁性装置分离细胞（步骤5）。5min之后，将未结合的细胞悬液移入新管，进行二次分离。计数细胞（附录3A）。重悬细胞于包被液中，浓度为2×10^7个细胞/ml。
8. 如果需要完全清除单核细胞，重复步骤5～7。流式细胞仪分析细胞群体类型以检测纯度。为了检测有无包被细胞污染，需要设置对照，即不加抗体只加入FITC偶联的抗IgG。要评估所有抗体的包被情况，可用CD3单克隆抗体标记细胞（单元4.1）。
9. 冷藏保存细胞（附录3B）或者立即用于表型分析或功能实验。如果需要，使用前可4℃保存细胞12～24h。

参考文献：Funderud *et al.*，1987；Horgan *et al.*，1990

撰 稿 人：Kevin Horgan and Stephen Shaw

单元8.4 免疫磁珠法分离B细胞亚群

基本方案

与阴性选择不同，阳性分选不需要特异针对每种欲清除细胞的抗体。尽管阳性分选理论上可能改变细胞的功能，但是B细胞特异性抗体，如抗CD19标记分离出的B细胞，其信号强度相对较低，所显示出的有丝分裂和抗体分泌反应都与阴性筛选得到的B细胞类似。为预防阳性选择可能激活细胞，可用抗体的$F(ab')_2$片段。

注：所有试剂及接触活细胞的器械必须无菌。所有操作在低温房间里于冰上4℃无菌进行。

材料（带√项目见附录1）

抗凝血（附录3G），或者从全外周血中（单元8.1）或组织中（单元7.8）分离的新鲜PBMC或冷藏保存的PBMC（附录3B）

1% FBS（热灭活）溶于冷的PBS（附录1，无钙离子）中

免疫磁珠偶联的抗CD19抗体（4×10^8个细胞/ml；Dynal）

√冷的RPMI-10完全培养基

25cm²和75cm²细胞培养瓶（如Corning）

15ml和50ml聚丙烯试管（如Falcon）

磁性分离装置（Dynal MPCI或者Perspective Diagnotics BioMag Separator）或者强磁铁

摇床，4℃

Detach-a-bead（Dynal），可选用

1a. 抗凝血的处理：用 3 倍体积的含 1%FBS 的 PBS 稀释 5～50ml 血于 $75cm^2$ 细胞培养瓶，冰浴。

1b. 已分离 PBMC 的处理：用冷的含 1%FBS 的 PBS 重悬细胞于 15ml 聚丙烯试管，浓度为 $1\times10^7\sim2\times10^7$ 个细胞/ml（附录 3A），冰浴。

2. 剧烈振荡磁珠包被的抗 CD19，加入至 15ml 聚丙烯试管中。每个靶细胞加 4～10 个磁珠（如每 1ml 未稀释的血样或者 PBMC 加 5～12.5μl Dynal 磁珠，估计全血含细胞为 5×10^5 个细胞/ml）。

3. 加入 10ml 冷的 1%FBS，振荡，用磁性装置或者强磁铁将磁珠吸引至管壁。等待约 5min 使磁珠聚集至贴近磁铁处，将注射器尖端置于管底吸出液体。

4. 重复步骤 3，然后用 1～2ml 冷的 1%FBS 重悬磁珠，将磁珠加入含血样的培养瓶中（步骤 1a）或者含 PBMC 的 15ml 离心管中（步骤 1b）。在摇床上以 6～10r/min 转速，4℃孵育 30min（这一转速能够充分混合细胞和磁珠而不致破坏细胞）。可以取部分细胞在显微镜下观察以确定磁珠围绕于某些细胞周围，而不存在于另一些细胞周围。

5. 用磁性装置分离细胞（步骤 3）。用注射器尖端置于瓶底或管底收集未结合细胞。将培养瓶或离心管脱离磁场，用 10ml 冷的 1%FBS 重悬磁珠。

6. 重复步骤 5 不少于 5 次。最后一次分离后，不再重悬磁珠。

帽化法解离与磁珠结合的 B 细胞

7a. 用 10ml 冷的 RPMI-10 完全培养基重悬结合磁珠的细胞，转移入 $25cm^2$ 细胞培养瓶，在 37℃，5%CO_2 培养箱中孵育过夜。

8a. 重悬细胞于 15ml 管中，室温下磁性分离免疫磁珠（现在已经从细胞上脱离）。吸取未结合的细胞悬液至新的 15ml 管中。如果需要，重复分离去除多余的磁珠。

9a. 4℃，150*g* 离心细胞 10min，弃上清，以适当浓度重悬细胞于冰冷的 RPMI-10 完全培养基中（或者其他适当培养基）。用流式细胞仪检测纯度（单元 4.2）。

用 Detach-a-bead 多克隆抗体解离 B 细胞

7b. 用 100μl 冷 RPMI-10 完全培养基重悬结合磁珠的细胞，转移入 15ml 管中，加入 10μl（1U）Detach-a-bead，摇床上（如 orbital 摇床）室温孵育 45～60min。确保细胞沉于管底。

Detach-a-bead 是一种能够与小鼠单克隆抗体的 Fab 片段结合的多克隆抗体，因而可打断细胞与磁珠的连接。

8b. 用 7ml 冷的 RPMI-10 完全培养基重悬细胞，将试管放入磁场分离免疫磁珠。注射器尖端置于瓶底或管底收集未结合细胞悬液至新的 50ml 置于冰浴的离心管中。重复 2 或 3 次，将细胞悬液倒入同一离心管中。

9b. 4℃，150*g* 离心细胞 10min，弃上清，重悬细胞于冰的 RPMI-10 完全培养基中（或者其他适当培养基），再次离心。重复洗 1 或 2 次或者多次，以适当浓度重悬细胞于冰的 RPMI-10 完全培养基中，流式细胞仪检测纯度（单元 4.2）。

参考文献：Funderud *et al.*，1990；Thompson *et al.*，1984

撰稿人：Judy B. Splawski，Peter E. Lipsky，Eli M. Eisenstein，and Kevin S. Chua

单元 8.5　单核细胞/巨噬细胞的分离

注：若无特别声明，本章所有孵育过程均在37℃，5%CO_2饱和湿度培养箱中进行。所有试剂及接触活细胞的器械必须无菌。

基本方案 1　贴壁法分离单核细胞

本法快捷简单，但会诱导细胞的活化。

材料

外周血单个核细胞（单元 8.1）
无血清 DMEM（如 GIBCO/BRL），添加 2mmol/L 左旋谷氨酰胺和 50μg/ml 庆大霉素
0.02%（*m/V*）EDTA 溶于 PBS（附录 1；致热原含量低，无钙镁离子），可选用
75cm^2组织培养瓶（如 Falcon）
塑料细胞刮
15ml 聚丙烯离心管
Beckman GPR GH-3.7 水平转头离心机（或者类似设备）

1. 用无血清 DMEM 重悬 PBMC，浓度为 2×10^6个细胞/ml（附录 3A）。每个 75cm^2组织培养瓶中加入 10ml 细胞悬液，37℃，5%CO_2培养箱中孵育 1h。
2. 弃上清，用 10ml 上述无血清 DMEM 洗培养瓶 2 次，更换新的 DMEM，去除残留的非贴壁细胞。
3. 用塑料细胞刮轻轻刮下贴壁细胞，或者用冷的含 0.02% EDTA 的 PBS 孵育细胞 10min，将细胞吹下收集。将细胞放入 15ml 锥形离心管，GH-3.7 水平转头离心机 300*g* 离心 10min。弃上清，用无血清 DMEM 重悬细胞，计数单核细胞。

　　单核细胞可直接在其贴壁的培养瓶中培养（即跳过步骤 3）。

基本方案 2　根据大小沉降作用分离单核细胞

注：来源于硅化的胶体颗粒可能活化单核细胞。

材料（带√项目见附录 1）

胎牛血清（FCS；56℃热灭活 1h）
外周血单核细胞（PBMC；8.1 单元）
√HBSS
Percoll（密度 1.130g/ml，17mosM/kg；Pharmacia）
√2×PBS（GIBCO/BRL）
15ml 锥底聚丙烯离心管
Beckman GPR GH-3.7 水平转头离心机（或者等效设备），18～20℃和 4℃

15ml 聚碳酸酯离心管（Sorvall）
SS-34 固定角转头 Sorvall RC2-B 离心机（或者等效设备）
无菌的巴氏吸管

1. 在 15ml 离心管中加入 3ml FCS，并轻轻将 PBMC 加在上面，用带 GH-3.7 转头的离心机 18～20℃，200*g* 离心 10min。弃含血小板的上清。用含 10%FCS 的 HBSS 重悬沉淀，每 1～2ml 含 2×10^7～5×10^7 个细胞（附录 3A）。
2. 在 15ml 聚碳酸酯离心管中加入 7ml Percoll 和 6ml 2×PBS。用带 SS-34 转头 Sorvall 离心机 21 000*g* 室温离心 40min，形成连续的梯度。
3. 轻轻将无血小板的单核细胞加到形成的梯度上，4℃，1000*g* 离心 20min。
4. 用无菌的巴氏吸管仔细吸去顶层不透明带的细胞（死细胞、碎片和少量血小板）。用新的离心管收集含 70%～90%单核细胞和一小部分淋巴细胞及残留血小板的第二层。弃去含有第三层（淋巴细胞和少许单核细胞）和第四层（粒细胞和红细胞）的管子。洗涤并计数第二层的细胞。

基本方案 3　对流离心洗淘法分离单核细胞

与贴壁法和沉降法大不相同，这一方案不引起单核细胞活化。要详细了解本系统如何由生产商改进而来的，见单元 CPI 7.6 。

材料（带√项目见附录 1）

70%（*V*/*V*）乙醇
√低致热原的，无钙镁离子 PBS
聚蔗糖-泛影葡胺密度梯度沉降法分离的外周血单个核细胞（PBMC）（单元 8.1 ）
DMEM
50%（*V*/*V*）含氯漂白溶液
Beckman 洗淘化系统：JE-6B 转头的 J-6M 洗脱离心机，18℃，频闪仪，70ml（或者 30ml）标准洗脱室
2ml 吸管
硅胶管，1/4×118in
Masterflex 泵（1～100r/min，10 匝电位计，115VAC，7014 泵头；Cole-Parmer）和硅树脂管（Cole-Parmer）
环架和吸管架
Beckman GPR GH-3.7 水平转头离心机（或者其他同类设备）
10ml 吸管或 10ml 注射器
50ml 聚丙烯离心管

1. 按照原设计说明安装洗脱转头和频闪仪装置。

   如果期望获得>1.5×10^9 个单核细胞，将一个二级标准分离室安装到旁路室的转头上。将这个分离室与转头柄顶端的指示计的销相固定，而不是固定于销的孔洞，并且确定下文所介绍的洗脱过程中使用的流速能够洗脱大部分淋巴细胞而留下单核细胞。

2. 在添加密闭罩之前，通过将旋转密封器压向柄部以确定旋转密封器对密闭罩的弹簧力。当压力解除时，弹簧应使旋转密封器回复。在开始前检查柄顶部的 O 环有无损坏。
3. 如图 8.5.1 所示安装离心机上从组织培养罩到转头的入口线（不按照制造商说明）。将 2ml 移液管连接至硅胶管，再连接 Masterflex 泵入口处的硅树脂管。如图 8.5.2A 所示用硅胶管安装样品池。将泵出口端的硅树脂管与样品池装置的硅胶管按照图 8.5.1 所示连接起来。不要使用设备提供的压力指示计，这会成为污染原因之一。

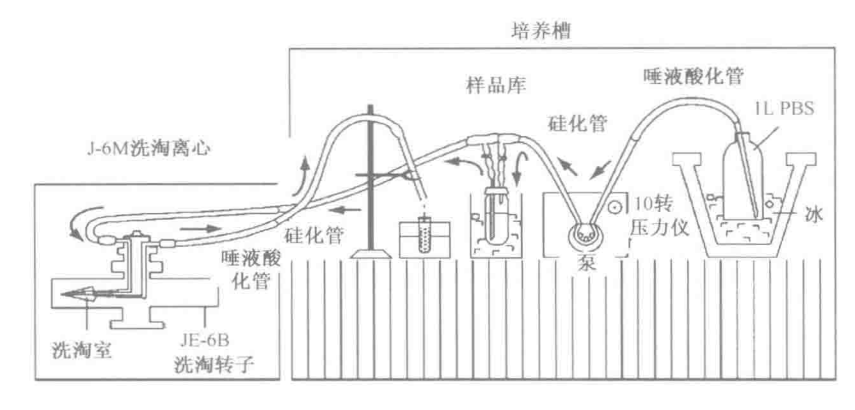


图 8.5.1　对流离心洗脱系统的设计。

4. 按照制造商的说明连接从转头至硅树脂管的硅胶出口管道。将此管连回至组织培养罩，再连接一个带有小截硅胶管的 2ml 移液管，并缚于环的支架上（图 8.5.1）。
5. 为了给洗脱系统消毒灭菌，将入口管道的移液管浸入一个含有 300ml 70%乙醇的烧杯中，打开泵使流量速率为 5～8ml/min（使用泵的 10 匝电位计上的设置，相应的流速为5～19ml/min）。调单元三通旋钮至适当位置使其流入样品池。当乙醇流过系统时，用烧杯在连接于出口管道的移液管下方回收，用手顺时针转动转头，直至转头中所有的空气排净。将样品池移开，保留连接管道的针头，通过开关三通装置使得 70%乙醇从装置的每个端口流过。之后调单元三通开关使样品装置再次消毒，并泵出系统中残存的乙醇。
6. 在乙醇消毒方案之后，入口管道加入 PBS，通过洗脱系统泵出 400ml PBS，确保管道和转头中的气泡全部排空。用 70%乙醇冲洗样品室，之后再用 PBS 冲洗样品室，随后重新连接样品室装置开关。
7. 用 PBS 重悬 PBMC，GH-3.7 转头离心机室温，200g 离心 10min。确定上清和重悬的单核细胞沉淀混合于 30ml PBS 中。
8. 在库尔特粒度仪上选择计数细胞（附录 3A），确定单核细胞大致数目。这一仪器描述了淋巴细胞间距（第一个峰）和单核细胞间距（第二个峰），从而提供了细胞大小的剖面图。
9. 调位于样品池装置入口处和出口处的三通流量旋钮（图 8.5.2A），用连接于注射口的移液管或者注射器吸空样品池。用 10ml 移液管或者注射器通过连接在长针头管道的三通装置将细胞加入样品池（图 8.5.2）。将管道充满 PBS 以确保没有空气进入注

射口管道。将移液管或注射器移开前，调单元三通旋钮至 90°，以关闭注射口。将相对的三通旋钮也调至 90°（洗脱程序开始后管道中的空气将会被阻隔在样品室中）。

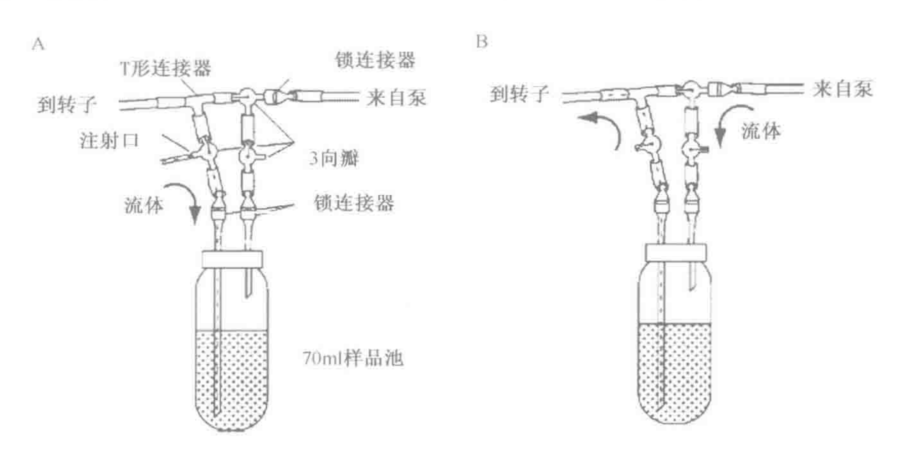


图 8.5.2　样品池的构造。A. 加入细胞时；B. 洗脱时。显示的是 70ml 的样品池，也可使用 30ml 的样品池。

10. 设置 J-6M 离心机 500*g*，18℃，以及样品池装置顶端的三通流量，使液体能够直接通过短针进入小室中（图 8.5.2B）。
11. 设置泵流量为 10ml/min。泵入 300ml PBS 使所有细胞进入样品池，并从分离室中洗脱大部分淋巴细胞。间断性地使样品池振动（抑制细胞沉降），库尔特粒度仪上监测洗脱器中出来的细胞大小以确保只有淋巴细胞被洗脱。
12. 以 0.5ml/min 逐渐增加流量，每次增加流量时泵入系统 100～150ml PBS。继续监测细胞大小。
13. 当洗脱器出口单核细胞与淋巴细胞的比例超过 50%（通常为 11.5～12ml/min）时，增加流量至 19ml/min，收集出口处的单核细胞于 6 个 50ml 离心管中。关掉离心机并用 PBS 洗出残留的细胞或团块。
14. 室温，150*g* 离心细胞 10min，用 DMEM 重悬细胞。库尔特粒度仪上确定单核细胞的数量。如果需要，进一步用流式细胞仪（单元 4.2）或者非特异酯酶标记（附录 3D）检测纯度。
15. 泵入蒸馏水并风干洗脱系统。间断性泵入系统 50%氯石灰溶液去除残存的蛋白质。洗脱完成后将转头拆卸下来，减少生锈和腐蚀。

参考文献：Edelson and Cohn，1976；Wahl *et al.*，1984

撰 稿 人：Larry M. Wahl and Phillip D. Smith

单元 8.6　人自然杀伤细胞的分离

注：所有试剂及接触活细胞的器械必须无菌，应正确使用无菌技术。

注：本方案不适于将产生的 LAK 细胞回输患者体内。

基本方案 从 PBMC 分离人 NK 细胞

材料（带√项目见附录 1）

肝素抗凝血（Becton Dickinson）或者浓缩白细胞
√HBSS 或 PBS
√RPMI-2 NK 细胞完全培养基，4℃和 37℃
√RPMI-10 NK 细胞完全培养基，37℃
单克隆抗体，用滴定法测得饱和浓度（辅助方案）
磁珠偶联的羊抗小鼠 IgG（如 BioMag、PerSeptive Biosystems、约 5×10^8 个磁珠/ml），4℃保存
30ml 注射器
√无菌 30ml 尼龙毛柱
一次性 Luer-Lok 三通管，19G 针头
50ml 聚丙烯锥底离心管，带盖型
Sorvall 离心机及 H-1000B 转头（或类似设备）
14ml 圆底聚苯乙烯管，带螺旋盖型
磁性分离器（如 Dynal、PerSeptive Biosystems 或 Miltenyi Biotec）及磁铁

1. 用 30ml HBSS 或者 PBS 稀释肝素抗凝的全血或者白细胞。
2. 用聚蔗糖-葡胺离心法分离 PBMC（单元 8.1），但步骤 3 中用 RPMI-2 NK 细胞完全培养基代替 HBSS 洗涤细胞，步骤 4 中用 RPMI-10 NK 细胞完全培养基重悬PBMC，浓度为 1×10^8 个细胞/ml。用台盼蓝染色检测细胞活力（附录 3C）。
3. 为去除 B 细胞和单核细胞，将无菌 30ml 尼龙毛柱与三通管和 19G 针头相连。每 5ml 的细胞悬液需一个尼龙毛柱。用 20ml 37℃的 RPMI-2 NK 完全培养基洗涤柱子后，再用 20ml 37℃的 RPMI-10 NK 培养基洗涤。盖好后，置 37℃，5%CO_2培养箱中培养 1～4h。保持柱子湿润。
4. 即刻用 30ml 37℃的 RPMI-10 洗涤尼龙毛柱，再加入 5ml 细胞悬液（步骤 2；5×10^8 PBMC），使液体进入尼龙毛柱。然后再加入 2～3ml RPMI-10 保持柱子湿润，盖好后置 37℃，5%CO_2培养箱结合 1h。
5. 在柱子中加入 40ml 37℃的 RPMI-10，轻轻洗脱细胞，并收集于 50ml 锥底聚丙烯离心管中。
6. 500～550g 离心细胞 10min，弃上清，用 40ml 37℃的 RPMI-2 NK 培养基重悬细胞沉淀。再次离心，弃上清，重悬细胞沉淀于 5～10ml 37℃的 RPMI-2 NK 细胞完全培养基中。细胞计数板计数（附录 3A）。通过 4 根尼龙毛柱纯化 2×10^9 个细胞/ml 初始 PBMC，预期回收 1.2×10^9～1.6×10^9 PBMC。
7. 用 4℃的 RPMI-2 重悬 PBMC 调整浓度为 1×10^8 个细胞/ml。加入所需的各种单克隆抗体（如 10～50μl；见辅助方案）。冰浴 30min，期间混匀几次。
8. 当细胞与抗体孵育时，每 1×10^8 个淋巴细胞加 2ml 磁珠原液（约 5×10^8 个磁珠/ml）（磁珠：细胞＝10：1），混合并加入到预先含有 2～5ml 4℃RPMI-2 的 14ml 圆底试

管中。将试管放入磁性细胞分离器或者强磁铁中，当磁珠牢固结合在靠近磁铁的一面后，用移液管慢慢吸出多余液体。加入 2～5ml 新的 4℃RPMI-2 培养基重悬管中留下的磁珠。重复磁性分离和洗涤至少 4 次。

9. 用 4℃的 RPMI-2 培养基重悬结合磁珠的细胞，使浓度为 10^8 个细胞/ml。
10. 参照步骤 6 用冷的 RPMI-2 培养基洗涤步骤 7 的细胞 2 次，调整浓度为 10^8 个细胞/ml。
11. 在 14ml 圆底试管中混合 1ml 细胞悬液和 10ml 磁珠悬液，冰上孵育 30min，每 5～7min 混匀一次，每管细胞应少于 4×10^8 个细胞/ml。
12. 加入 7ml 4℃的 RPMI-2 培养基，盖好试管后，上下颠倒 3 次混匀细胞。将试管放入磁性分离器，使细胞沿管壁沉降。约 3min 后，用移液管吸出沉降下来的细胞，移入新的 14ml 圆底试管中，并确保不要影响磁场中截留的细胞。将新管也置于磁场，使其中的细胞继续与磁场作用 3min。
13. 将细胞悬液吸入 50ml 锥底离心管，500～550*g* 离心。台盼蓝染色确定活细胞数量。
14. 将所有细胞置于 1 或 2 个 14ml 试管中，按磁珠：细胞为 30：1 的比例洗涤磁珠（步骤 8 和 9）并分离细胞（步骤 11 和 12）。洗涤阴性分选所得细胞，台盼蓝染色计数活细胞。2×10^9 PBMC 预期可得到 1×10^8～2×10^8 个 NK 细胞。
15. 用流式细胞仪双色标记法（单元 4.2）检测 $CD3^-CD56^+CD16^+$ 细胞，确定 NK 细胞的纯度（T 细胞需＜5%）。用 4h^{51}Cr 释放实验测定 NK 细胞的抗肿瘤活性。

辅助方案 阴性选择分离 NK 细胞的单克隆抗体的滴定

NK 细胞特征性的表型为：$CD56^+CD16^+CD3^-CD19^-CD14^-CD15^-$。因此采用阴性选择去除杂细胞分离人的 NK 细胞所需的单克隆抗体（MAb）包括：小鼠抗人 CD3（anti-T3），抗人 CD5（anti-T1），抗人 CD19（anti-B cell），抗人 CD14（anti-monocyte），以及抗人红细胞。这些抗体可以从公司购得（如 Dako）或者从 ATCC 获得杂交瘤自行制备（单元 1.3）。ATCC 可以提供的小鼠杂交瘤细胞有：#CRL8001（anti-CD3），#CRL8003（anti-CD5），#HB8612（anti-B cell），#HB44（anti-monocyte），以及 #HB8160（anti-glycophorin A/anti-erythrocyte）。所有的单克隆抗体都在 4℃保存。

由于各细胞表型的差异，使从单个核细胞中去除 T 淋巴细胞（$CD3^+$），B 淋巴细胞（$CD19^+$）和单核细胞（$CD14^+$），从而使分离 NK 细胞成为可能。

在选定了用于标记淋巴细胞和单核细胞的单抗后，需要用间接荧光法确定（单元 4.1）这些抗体的最佳工作浓度。间接荧光法为：先用梯度稀释的单抗标记 PBMC，然后加入荧光素偶联的二抗。通过流式细胞仪检测饱和浓度以确定最佳工作浓度。可参考本章第一部分所用免疫磁珠的工作浓度来确定本实验所用抗体的稀释度。通常，标记淋巴细胞的商业化单抗及用免疫磁珠阴选这些细胞的最佳浓度为 1μg/10^6 个细胞。对于新批次的抗体，应通过滴定与前一批次进行比较。

抗体的 F $(ab')_2$ 片段也具有结合抗原的功能，但若用抗体的 F $(ab')_2$ 片段进行分选价格又太昂贵。但可避免完整抗体中 Fc 片段与 NK 细胞表面 FcR 的非特异结合，因此我们也推荐采用抗体的 F $(ab')_2$ 片段。

参考文献：Nagler *et al.*，1989；Whiteside and Herberman，1990

撰 稿 人：Theresa L. Whiteside

单元 8.7　流式细胞仪检测全血的人淋巴细胞

基本方案

与分析 Ficoll 分离后的单个核细胞相比，本方法分析全血细胞，因而所用时间短，需要的样本量少，并且可以避免 Ficoll 分离后的细胞，尤其是 B 细胞的损失。

材料（打√项目见附录 1）

全血，通常用 EDTA 抗凝
√PBS，有或无 0.1%（*m/V*）叠氮钠，过滤除菌
单克隆抗体（标记的，未标记的或生物素化的），通过滴定确定最佳工作浓度
间标二抗（仅用于未标记的一抗）
FITC 标记的链霉亲和素或 PE 标记的链霉亲和素（仅用于生物素化的一抗）
裂解液：如低渗平衡盐溶液，去离子水，ACK 裂解液（附录 1），或商品化的裂解液（如 FACs-lyse，Becton-Dickinson；Immuno-lyse，Coulter；Whole Blood Lyse and Fix reagent，Gen Trak）
1%（*m/V*）多聚甲醛，pH7.4
12mm×75mm 圆底离心管（Falcon）
Beckman 带有 JS-4.2 转子的 J-6M 冷冻离心机（或替代离心机）

1. 采集患者的全血，对正在用单抗处理的或用单抗治疗后体内已经产生人抗鼠的抗体(HAMA)的患者，每 100μl 全血加入 3ml PBS 洗涤。
2. 当全血来源于白细胞增多患者时（$>15\times10^6$ 个白细胞/ml），应用 PBS 稀释至约 8×10^6 个细胞/ml。
3. 在 12mm×75mm 离心管中加入 100μl 全血及适量的单抗（5～20μl）。选用以下任一方法标记细胞：
   a. 用一种或两种荧光标记的抗体进行直接法标记。
   b. 用未标记的一抗和荧光标记的二抗进行间接法标记。
   c. 用生物素化的一抗和 FITC 或 PE 标记的链霉亲和素进行间接法标记。

   对照的设置包括：未标记的细胞、同型抗体对照和荧光标记的无关抗体对照（间接法标记时）。
4. 裂解液裂解红细胞（RBC）（单元 8.2，辅助方案 1，商品化的裂解液参考说明书）。加入 3～4ml 含有 0.1%叠氮钠的 PBS。300*g* 离心 8min。小心地吸弃上清，再洗涤两次。加入 0.1ml 1%多聚甲醛（pH7.4）。
5. 固定细胞。4℃避光待检（≤1 周）。流式检测前加入 0.6～1.0ml 无菌的 PBS。
6. 设定前向角散射和侧向角散射参数以分别了解细胞的大小和物理特性（图 8.7.1）。侧向角散射最好选用对数坐标（当然，也可使用线性坐标）。
7. 通过设门技术可以用荧光标记的抗体识别单核细胞（$CD14^+$）和所有白细胞

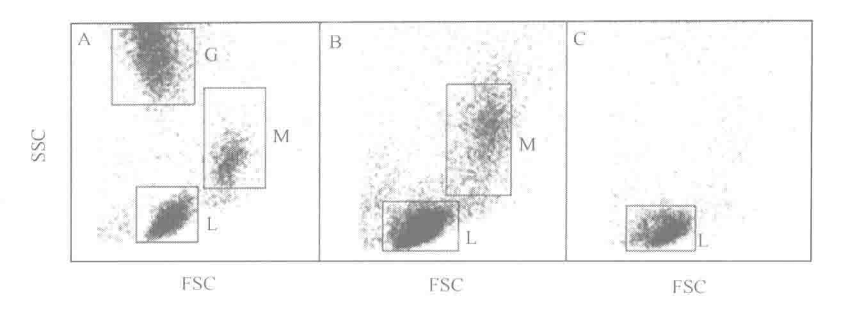


图 8.7.1　前向角和侧向角散射的点图。A. 全血裂解物的正常对照；B. 经 Ficoll 分离后；C. Ficoll 分离后去除了单核细胞。图中框出的细胞代表了粒细胞（G)、单核细胞（M）及淋巴细胞（L)。

(CD45⁺)。用单核细胞的特定标志可以区分位于淋巴细胞门内的“污染的”单核/巨噬细胞（因为某些单核细胞的非荧光参数和淋巴细胞的极为相似）。用白细胞标志可以将非淋巴细胞（如细胞碎片、血小板、有核红细胞）设出门外，并且可以分析淋巴细胞门内的细胞类型（图 8.7.2)，最大限度地圈出 $CD45^+/CD14^-$ 淋巴细胞，建立淋巴细胞门。考虑到假阳性的发生，门内单核细胞比例应大于 5%（图 8.7.3)。应用 CD45/CD14 进行荧光设门也可以证实淋巴细胞未被圈出淋巴门之外。若非荧光参数（前向角和侧向角散射）淋巴细胞门包含了小于 95%的淋巴细胞，则应重新设门。值得注意的是大颗粒淋巴细胞，如白血病细胞或淋巴瘤细胞及活化的淋巴细胞

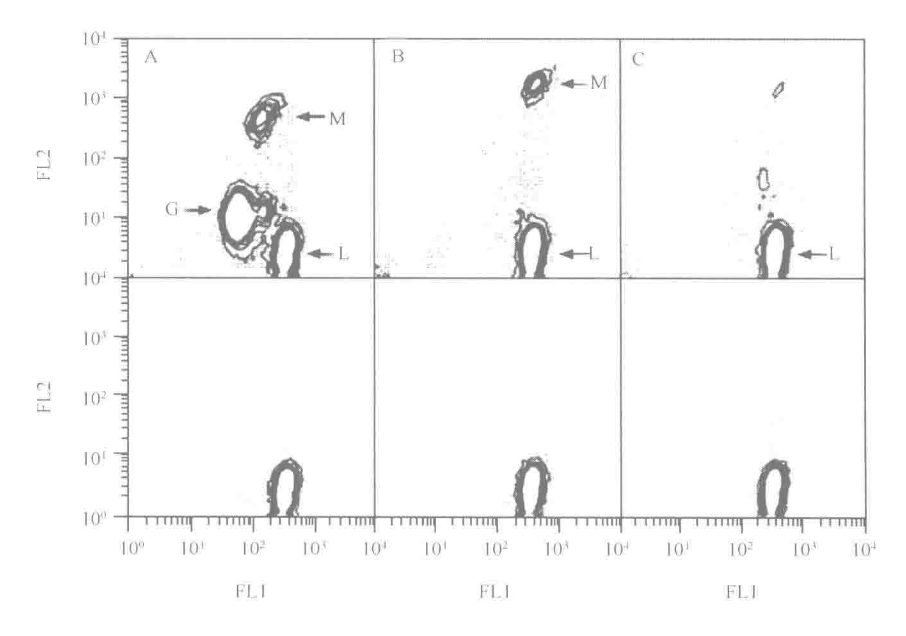


图 8.7.2　代表抗 CD45（FL1）和抗 CD14（FL2）荧光强度的双色等高线图。A. 全血裂解物；B. 经 Ficoll 分离后；C. Ficoll 分离后去除了单核细胞。上一排代表了分离后的所有白细胞，而下一排为淋巴细胞门内的细胞。三类主要的细胞亚群为单核细胞（M)、粒细胞（G）及淋巴细胞（L)。

未必能进入标准的淋巴细胞门。

假如淋巴细胞门内 $CD45^+/CD14^-$ 淋巴细胞小于 90%，那么有必要对阳性淋巴细胞亚群的百分比进行校正。

8. 用淋巴细胞内参确定数据的可靠性。例如，将 T 细胞（CD3）、B 细胞（CD19 或 CD20）和 NK 细胞（CD16 或 CD56）三群细胞相加应该等于淋巴细胞门中的 $CD45^+/CD14^-$ 细胞（总淋巴细胞）。

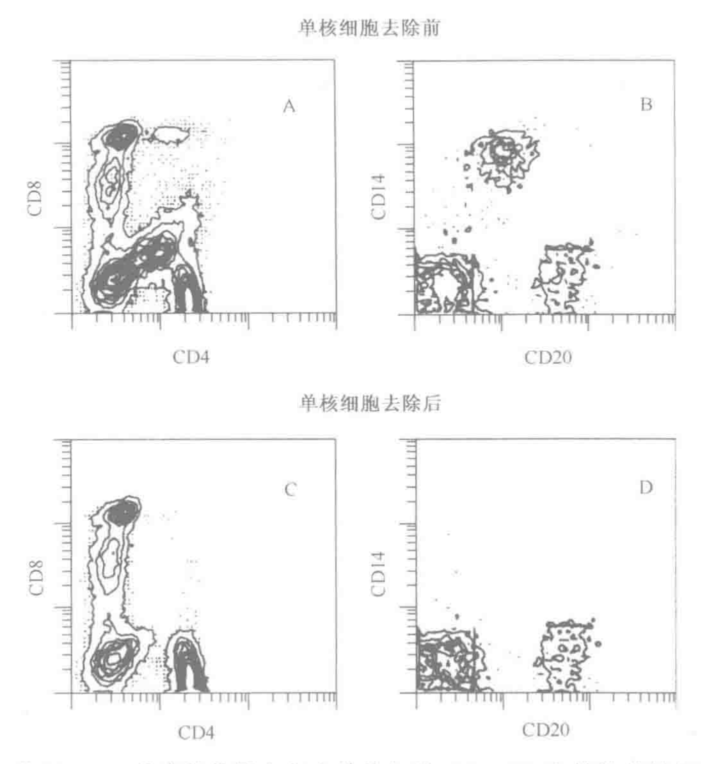


图 8.7.3 Ficoll-Hypaque 分离的外周血包含单核细胞（A，B）和排除单核细胞的（C，D）双色轮廓图。在 A 图和 C 图中，T 细胞用 CD4 和 CD8 标志显示；在 B 图和 D 图中，B 细胞用 CD20，单核细胞用 CD14 显示。本图举例说明去除单核细胞进行淋巴细胞分析的必要性。摘自 Fleisher *et al*.，1998。

参考文献：Fleisher *et al*.，1988；Melamed *et al*.，1990

撰 稿 人：Thomas A. Fleisher and Gerald E. Marti

单元 8.8　淋巴细胞增殖实验

注： 除非特别说明，细胞均置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养。活细胞接触的所有试剂与器材应无菌。

基本方案　丝裂原诱导的外周血单个核细胞增殖实验

其他多克隆刺激因子与T细胞表面抗原受体或辅助分子结合后，可诱导相应细胞的增殖，本方法调整后，也适用于检测这些因子诱导的细胞增殖（表8.8.1和表8.8.2）。

表8.8.1　诱导淋巴细胞增殖的活化剂[a]

细胞类型	靶分子	活化剂
T细胞	TCR	特异性抗原
	TCR-α和TCR-β	抗TCR MAb
	TCR相关CD3	抗CD3 PHA
	CD2	抗CD2和PHA
	CD28	抗CD28 MAb
B细胞	膜表面Ig	抗IgM和抗IgM SAC微球
	CD20	CD20 MAb
	CR2病毒受体	EBV
	BCGF受体	BCGF
B细胞和T细胞	离子通道	A23187伊诺霉素离子载体
	PKC	佛波酯
	CD25（IL-2R β链）	IL-2
	IL-4R	IL-4

a. 缩写：BCGF，B细胞生长因子；EBV，EB病毒；Ig，免疫球蛋白；IL，白细胞介素；MAb，单克隆抗体；PHA，植物血凝素；SAC，葡萄球菌A蛋白；TCR，T细胞受体。

表8.8.2　常用人淋巴细胞活化剂的来源和剂量范围

活化剂[a]	来源[b]	剂量范围
抗原		
破伤风毒素	Wyeth	1～20μg/ml
PPD	Parke-Davis	1～10μg/ml
丝裂原		
PHA	Wellcome Diagnostics	1～10μg/ml
ConA	Miles Laboratories	1～10μg/ml
美洲商陆蛋白	GIBCO/BRL	1∶100稀释
细胞		
同种非T细胞	单元8.2	1∶1～1∶10刺激细胞/反应细胞
自体非T细胞	单元8.2	1∶1～1∶10刺激细胞/反应细胞
离子通道		
伊诺霉素	Calbiochem	0.5μmol/L
佛波酯		
PMA	Sigma	0.5～10ng/ml
抗体		
抗CD3单抗（杂交瘤）	ATCC	3倍系列稀释法确定剂量
交联的抗IgM	BioRad	10～50μg/ml抗体

续表

活化剂[a]	来源[b]	剂量范围
淋巴因子		
IL-2	Genzyme	1～100U/ml
IL-4	Genzyme	1～100U/ml
BCGF	Cellular Products	终浓度的10%
其他		
葡萄球菌A蛋白	Calbiochem	1∶10 000～1∶100 000稀释

a. BCGF，B细胞生长因子；ConA，刀豆蛋白A；PHA，植物血凝素；PMA，佛波酯；PPD，苯二胺。

b. 本表只列出其中一个供货商，有些活化剂可由多家厂商提供。

材料（带√项目见附录1）

PBMC细胞悬液（单元8.1）

√RPMI-10完全培养基

100μg/ml植物血凝素（phytohemagglutinin，PHA），RPMI-10完全培养基配制（分装，－20℃保存）

96孔圆底细胞培养板

1. 计数PBMC（附录3A），加入RPMI-10完全培养基，调整浓度至1×10^6个细胞/ml。细胞混匀后，在96孔板每孔中加入100μl细胞悬液（每孔1×10^5个细胞；图8.8.1）。各实验组设3复孔（如丝裂原的不同浓度组）。不加丝裂原的对照孔作为本底，同样设3复孔。
2. 用RPMI-10完全培养基将100μg/ml PHA分别按1∶10、1∶20和1∶40（V/V）进行稀释。在96孔板的第1～3列（本底）每孔中加入100μl RPMI-10完全培养基；在第4～6列中加入1∶40稀释的PHA溶液100μl（终浓度2.5μg/ml），在第7～9列中加入1∶20稀释的PHA 100μl（终浓度5μg/ml），在第10～12列加入1∶10稀释的PHA 100μl（终浓度10μg/ml）。操作时应避免不同浓度或不同样品间的交叉污染。培养板置37℃，5%CO_2细胞培养箱中培养3d。
3. ^{3}H TdR掺入及后续检测参见辅助方案。

备选方案1　单向混合淋巴细胞反应

本方法用于检测照射灭活后或丝裂霉素C处理后淋巴细胞所诱导的同种异体淋巴细胞增殖反应。

附加材料（其他材料见基本方案）

RPMI完全培养基（RPMI-10AB）（附录1）：含10%人AB血清，56℃，1h灭活

同种异体刺激细胞（PBMC；单元8.1）

自体刺激细胞（PBMC；单元8.1）

丝裂霉素C溶液，0.5mg/ml，RPMI-10AB配制（避光，无沉淀），或细胞照射灭活设备

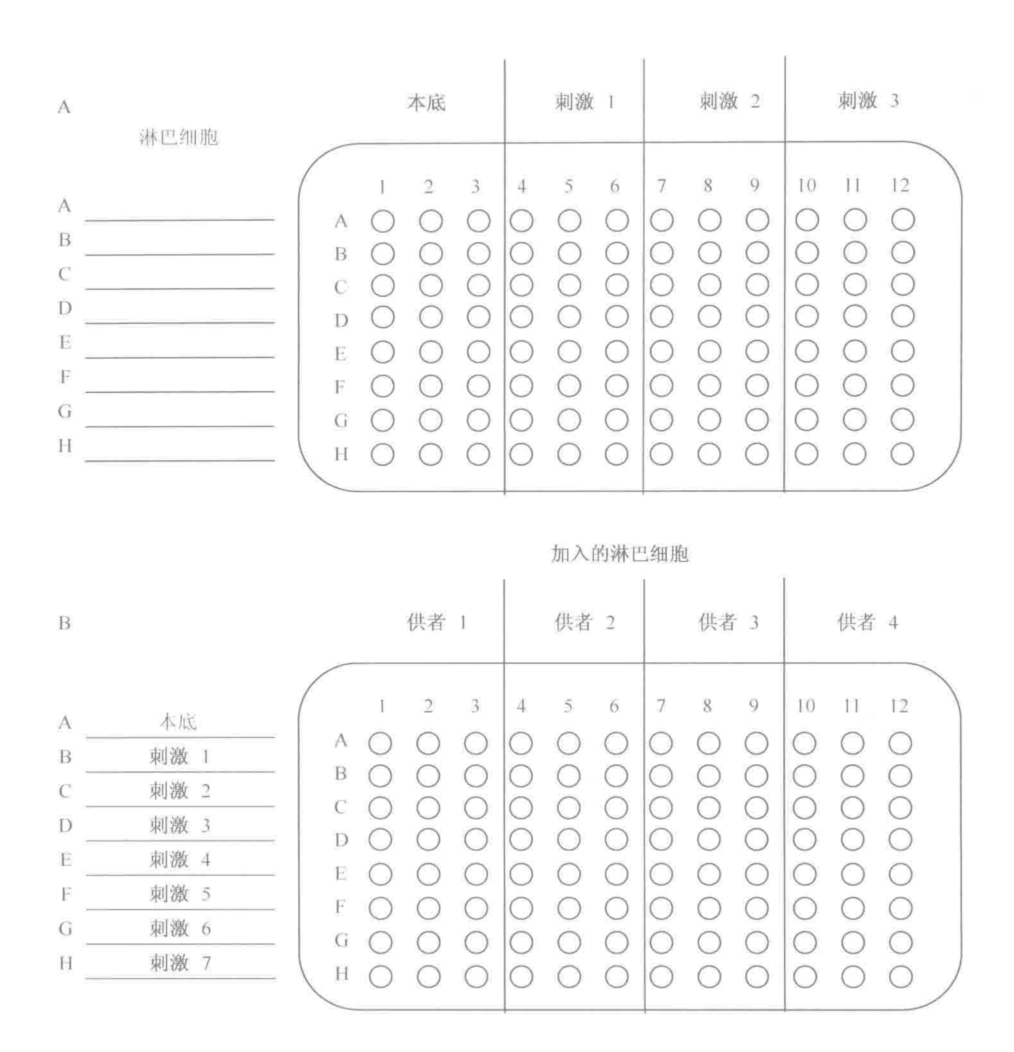


图 8.8.1 淋巴细胞增殖实验示意图。A. 此方法适用于检测不多于 3 种不同刺激诱导下不多于 8 种同种异体淋巴细胞（A～H)的增殖反应。B. 此方法适用于不多于 7 种不同刺激(B～H)诱导下不多于 4 种同种异体淋巴细胞的增殖反应。

1. 计数 PBMC（附录 3A)，用 RPMI-10AB 完全培养基调整浓度至 1×10^6 个细胞/ml。
2. 在同种异体 PBMC 刺激细胞和自体 PBMC 刺激细胞（对照组）中，加入 0.5mg/ml 丝裂霉素 C 至终浓度 25μg/ml。置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中作用 30min，然后用 RPMI-10AB 完全培养基将细胞至少洗涤 3 遍。细胞也可用 2000rad 照射灭活。调整细胞浓度至 1×10^6 个细胞/ml。
3. 混匀 PBMC 反应细胞，立即在 96 孔平底板中加入 100μl 细胞悬液。每实验组设 3 复孔。在相应孔中分别加入 100μl 照射灭活后或丝裂霉素 C 处理后同种异体或自体刺激细胞。对照组每孔中加入 100μl RPMI-10AB 完全培养基。培养板置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养 5～7d。
4. ^{3}H TdR 掺入及后续检测参见辅助方案。

备选方案 2 抗原诱导的 T 细胞增殖实验

此方法经调整后也适用于蛋白质或多糖抗原诱导的 T 细胞增殖实验（表 8.8.2）。

附加材料（其他材料见备选方案 1）

T 细胞（单元 8.2 和 8.3）
自体抗原呈递细胞（非 T 细胞；单元 8.2 和 8.5）
破伤风毒素（Connaught 或 State Laboratory Institute of Massachusetts）

1. 计数 T 细胞（附录 3A），用 RPMI-10AB 完全培养基调整浓度至 1×10^6 个细胞/ml。
2. 参照备选方案 1 中步骤 2，用丝裂霉素 C（或 2500rad 照射）灭活抗原呈递细胞。调整浓度至 2×10^5 个细胞/ml。
3. 在 96 孔板中加入 100μl T 细胞悬液和 50μl 灭活后抗原呈递细胞悬液，每种细胞在加样前应混匀。加入破伤风毒素至终浓度分别为 0、1、5、10 和 20μg/ml。每浓度设 3 复孔。培养板置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 6d。
4. ^{3}H TdR 掺入及后续检测方法参见辅助方案。

辅助方案 ^{3}H TdR 掺入和细胞收集

材料

50μCi/ml ^{3}H TdR [6.7Ci/(mmol/L)；Amersham 或 ICN Biomedicals]，RPMI-10 培养基配制（附录 1）
100%（V/V）甲醇
闪烁液（Ready Safe 或 Beckman）
同步细胞收集器（推荐使用半自动收集器；Cambrige Technology，Beckman，Pharmacia LKB Biotechnology 或 Skatron)，蒸馏水及蒸馏水罐
细胞收集器配套用滤纸，临用前用蒸馏水浸湿
灯和镊子（推荐使用）
液闪管

1. 细胞培养终止前 6h 或 18h，在每孔中加入 20μl 浓度为 50μCi/ml 的 ^{3}H TdR（每孔 1.0μCi)。可适当延长 ^{3}H TdR 掺入时间。
2. 使用全自动同步细胞收集器，洗涤、裂解细胞，并将 DNA 转移到滤纸上。每列细胞洗涤及吸引至少 10 次以确保细胞 DNA 被充分转移至滤纸上，且彻底洗掉未掺入的 ^{3}H TdR。100%甲醇洗涤滤纸条，使滤纸条易于干燥。使用半自动细胞收集器时，需将滤纸片放入对应的闪烁管中。人工收集时，将滤纸片置灯下烘干，然后用镊子将滤纸加入对应的闪烁管中。最后在闪烁管中加入闪烁液。
3. 用液闪仪检测样品的 cpm 值，要求标准差 $<2\%$。计算本底和样品的平均 cpm 值。复孔的变异度应 $<20\%$。
4. 根据仪器使用说明书彻底清洗细胞收集器。

参考文献：Clark *et al.*，1989；Geppert and Lipsky，1988

撰 稿 人：Stephen P. James

单元 8.9　B 细胞分泌抗体的检测

基本方案

以下以美洲商陆蛋白为例介绍丝裂原诱导的 B 细胞产生抗体。本方法经调整后也适用于其他多种刺激因子和淋巴细胞（表 8.9.1）。

表 8.9.1　常用的 B 细胞活化剂[a]

细胞类型	活化剂	备注
PBMC 或纯化的 T 细胞＋B 细胞	PWM	T 细胞依赖性 B 细胞活化
PWM 刺激后 PBMC 分离出的 B 细胞	PWM	B 细胞起始活化后，去除 T 细胞辅助，B 细胞活化需再补充 IL-2。适用于外源细胞或细胞因子作用的研究
纯化的 B 细胞或扁桃体 B 细胞	SAC＋IL-2	适用于研究缺乏 T 细胞时，外源细胞或细胞因子的作用
	抗 IgM 微球＋T 细胞培养上清	适用于研究 B 细胞不直接接触 T 细胞的情况下，外源细胞的调节作用；或者研究 T 细胞培养上清的作用
PBMC 或 B 细胞	EBV	适用于 B 细胞合成 Ig 的研究或 EBV 诱导的 B 细胞增殖和分化

a. 缩写：EBV，Epstein-Barr 病毒；PBMC，外周血单个核细胞；PWM，美洲商陆蛋白；SAC，葡萄球菌 A 蛋白。

注：除非特别说明，细胞均置 37℃，5%CO_2细胞培养箱中培养。活细胞接触的所有试剂和器材应无菌。

材料（带√项目见附录 1）

外周血单个核细胞（PBMC；单元 8.1）

√ RPMI-5 和 RPMI-10 完全培养基

√ PWM 溶液

96 孔平底培养板（Costar）

1. 计数 PBMC（附录 3A），用 RPMI-5 完全培养基调整浓度至 4×10^7个细胞/2ml。室温，400g 离心 10min，弃上清。加入 RPMI-5 完全培养基，重复洗涤至少 4 次。
2. 再次计数 PBMC，用 RPMI-10 完全培养基调整浓度至 5×10^5个细胞/ml。在 96 孔板中加入 0.2ml 细胞悬液（每孔 1×10^5个细胞）。各实验组设 2 复孔。避免使用培养板四周边缘的孔。细胞培养时间较长时，周边孔中应加满水以减少实验孔的液体挥发。
3. 加入 20μl PWM（最终稀释度 1∶100）诱导 PBMC 活化。本底对照组不加刺激。细

胞置于 37℃，5%CO_2细胞培养箱中培养（ELISPOT 检测，一般需培养 7d；ELISA 检测上清，需 10d）。

4. 收集细胞进行后续反向空斑实验（单元 7.13）、ELISPOT 检测（单元 8.11）或收集培养上清进行 ELISA 检测（单元 8.12）。

撰 稿 人：Stephen P. James

单元 8.10　ELISA 检测抗体的含量

基本方案

本方法可检测血清或细胞培养上清中 IgG、IgM 和 IgA（图 8.10.1）的含量。检测孔中液体颜色的深浅与上清中 Ig 的含量成正比。

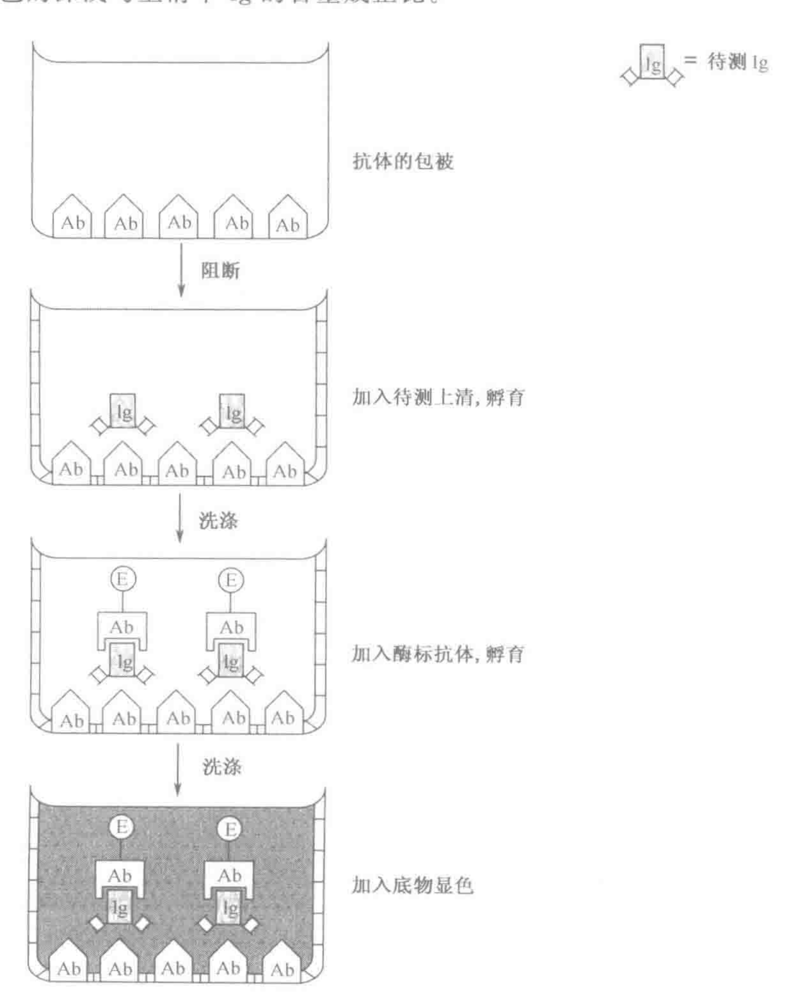


图 8.10.1　ELISA 双抗夹心法检测抗体的含量。Ab，抗体；E，酶。

材料

包被抗体：10μg/ml 羊抗人 IgM、IgG 或 IgA（IgG）抗体，包被缓冲液配制（附录 1）

洗液：0.05%（V/V）Tween 20，PBS 配制（附录 1）

阻断液：5%（m/V）BSA，洗液配制（滤过除菌，4℃保存）

稀释液：1%（m/V）BSA，洗液配制（滤过除菌，4℃保存）

IgG、IgA 和 IgM 标准品（ICN），稀释液或培养基配制

待测上清

酶标抗体：HRP 标记的羊抗人 IgM、IgG 或 IgA 抗体（Sigma 或 Jackson Immunoresearch），特异性针对 Fc 片段

1mg/ml 磷酸对硝基苯酯（Sigma），底物缓冲液配制（附录 1）

3mol/L NaOH，推荐使用

96 孔 ELISA 板（如 Immulon 4、Dynatech）

ELISA 板封膜（Dynatech）

酶联仪

1. 在 96 孔 ELISA 板中加入 100μl 浓度为 10μg/ml 的捕获抗体（用包被缓冲液配制）。盖好封膜，37℃包被 2h（或 4℃过夜），包被好的 ELISA 板置湿盒中 4℃可保存 1 月。注意避免液体挥发。
2. 在孔中加入洗液，洗涤 ELISA 板 5 次。用枪头吸干或者拍干残存的洗液。
3. 每孔加入 200μl 阻断液，室温孵育 1h，然后参照步骤 2 洗涤。
4. 用稀释液将标准品进行系列稀释（ELISA 常用的标准品工作浓度为 1～100ng/ml），每孔分别加入各稀释度的标准品 100μl，设 2 或 3 复孔。
5. 取待检上清 100μl 加入 ELISA 板中，设 2 复孔。加样时，未刺激的培养上清不必稀释。丝裂原刺激后培养上清可用稀释缓冲液进行 1∶10、1∶20 或更高倍数稀释。室温孵育 2h 后（或 4℃过夜），洗板。
6. 加入 100μl 酶标抗体，室温孵育 2h 或 4℃孵育过夜，洗板。
7. 加入 100μl 浓度为 1mg/ml 的磷酸对硝基苯酯（用底物缓冲液配制）。在酶联仪上读取样品的吸光值，波长 405～410nm。当标准品最高浓度孔的颜色达到酶联仪测量上限时，在每孔中加入 25μl 浓度为 3mol/L 的 NaOH，终止显色反应。
8. 以不同浓度标准品和相应的吸光值制作半对数标准曲线。在标准曲线的线性范围内计算出各样品的浓度。

参考文献：Chan and Peristein，1997；Kemeny and Challacmbe，1988

撰 稿 人：Thomas B. Nutman

单元 8.11　ELISPOT 检测抗体的含量

酶联免疫斑点实验（enzyme-linked immunospot，ELISPOT）可检测分泌相应抗体

的细胞数量。双色法可检测分泌抗原性不同的两种抗体的细胞数量。可通过预实验确定不同实验体系中阳性斑点（图 8.11.1）的标准，以区分阳性和假阳性结果。实验中还应包括以下对照组：无关抗原包被组、高浓度抗原竞争抑制组、未免疫动物细胞组和分泌无关抗体细胞组。

注： 活细胞接触的所有试剂和器材均应无菌。

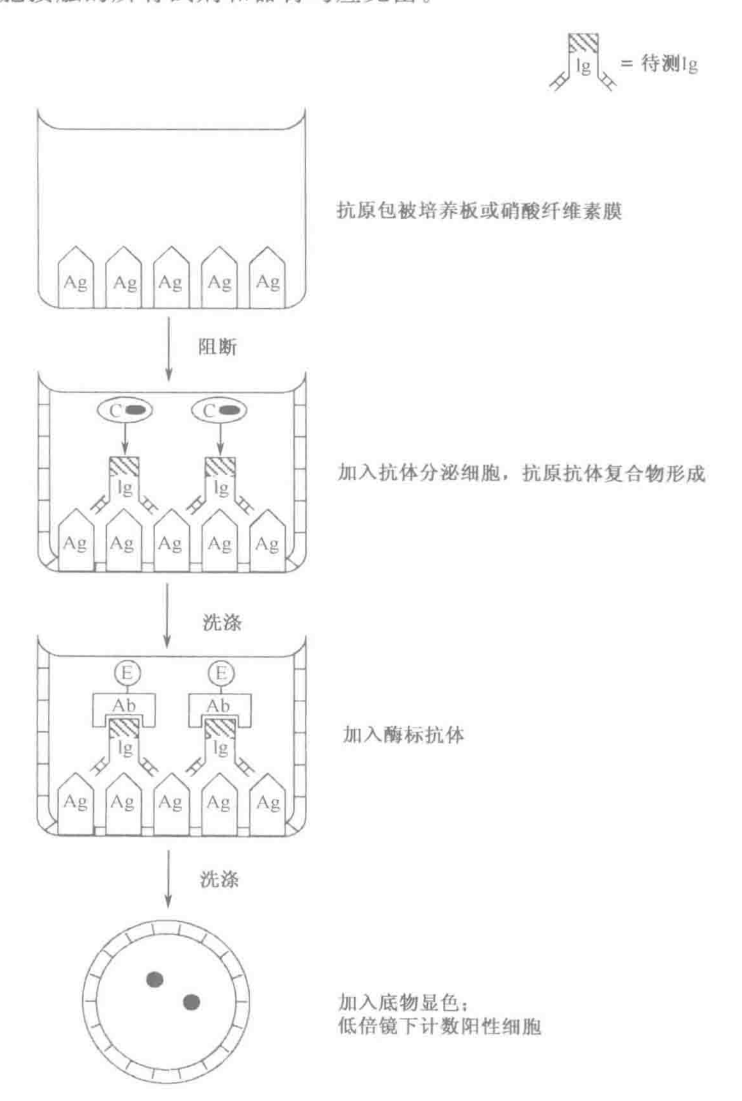


图 8.11.1　ELISPOT 检测法示意图。抗原（Ag）和抗体（Ab）分泌细胞（C）依次结合于固相表面，检测分泌抗体的单个细胞。E，酶。

基本方案　ELISPOT 检测分泌抗体的细胞

正式实验前，用抗体分泌细胞（如免疫小鼠脾细胞或 LPS 刺激的脾细胞）通过滴定法，确定抗原和显色抗体的最适工作浓度，此时 ELISPOT 斑点应最清晰。

材料（带√项目见附录1）

抗原：纯化的抗原或未标记的多克隆抗体（如羊抗小鼠IgG、Southern Biotechnology）

√PBS

√包被缓冲液（推荐使用；pH9.0）

含5%（*V/V*）FBS（56℃，30min灭活）的PBS或含1%（*m/V*）BSA的PBS，新鲜配制

待测细胞，如外周血单个核细胞（PBMC；单元8.1）或脾细胞

√完全IMDM-5培养基（过夜培养时应加入抗生素，如庆大霉素）

Tween/PBS：含0.05%（*V/V*）Tween 20的PBS

酶标显色抗体（如Southern Biotechnology，Dako或Tago）；使用未标记的一抗时需准备酶标二抗；使用生物素标记一抗时需准备酶标抗生物素（Sigma，Dako或Vector）

0.1%BSA/PBS：含0.1%（*m/V*）BSA的PBS

√HRP或AP显色底物：凝胶底物（用于聚苯乙烯平皿）或可溶性底物（用于硝酸纤维素膜）

蛋白质合成抑制剂（如100μg/ml放线菌酮；Sigma）

40mm或60mm聚苯乙烯平皿，6、24、48或96孔聚苯乙烯培养板（Nunc），或96孔硝酸纤维素Milliter HA板（Millipore）或类似产品

湿盒，置4℃

1. 将适量抗原包被在培养皿或多孔培养板上（用PBS或包被缓冲液配制，pH9.0）。通常用10～200μg/ml抗原检测分泌特异性抗体的细胞，或者用2～10μg/ml未标记的多克隆抗体（亲和层析纯化）检测分泌某一亚类抗体的细胞。置湿盒中4℃包被过夜（或37℃包被2h）。包被好的培养板或培养皿加盖密封4℃可保存几周左右。
2. 吸弃包被液。用PBS洗板3次，甩干残存的液体。加入含5%FBS的PBS或含0.1%BSA的PBS，37℃孵育30min，封闭非特异结合位点。
3. 吸弃封闭液。用IMDM-5培养基稀释待测细胞（一般为10^4～10^6个细胞/ml），将细胞悬液加入包被好的培养板或培养皿中（一般培养皿加300～500μl；96孔板加100～200μl）。置湿盒中37℃培养3～4h或4℃过夜（使用含碳酸盐的培养基时，培养时应补充5%～10%CO_2）。
4. 吸弃未结合细胞悬液，并用Tween/PBS洗涤培养板或培养皿。注意保持培养板湿润。
5. 用0.1%BSA/PBS将酶标显色抗体稀释至合适浓度（酶标抗体一般1∶250到1∶1000稀释，或浓度为0.5～5.0μg/ml）。在培养皿中加入2ml或在96孔板中加入50～100μl酶标显色抗体。
6. 使用未标记一抗或生物素标记一抗时，洗涤后还应加入酶标二抗或酶标抗生物素二抗，置湿盒中室温孵育2～3h或4℃过夜。
7. 用PBS洗涤培养皿或培养板。彻底吸弃残存的洗液。

8a. 针对平皿（单色分析）：每皿加入 2ml 凝胶底物或在 96 孔聚苯乙烯板中每孔加入 50μl 凝胶底物。使用 HRP 标记的抗体时，在凝胶底物凝固前，迅速倒掉多余的凝胶底物（在 96 孔板中加入 AP 标记的抗体时不需此步骤）。室温静置直至底物完全凝固（2～5min）。5～10min 后，观测蓝色或棕黑色斑点。

8b. 针对硝酸纤维素膜培养板（单色或双色分析），单色分析时：在 96 孔硝酸纤维素板中加入 50μl 可溶性底物。双色分析时：加入 AP 底物，室温静置 5～30min（或更长时间）显色（呈蓝色斑点）。PBS 洗板，然后加入 HRP 底物，室温静置 1～5min 显色（呈红色斑点）。用流水洗涤硝酸纤维素膜几秒钟。

9. 继续显色 2～24h 后（AP 底物一般显色 24h），在 10×～30× 显微镜下，计数斑点形成细胞（spot-forming cell，SFC）。使用相差显微镜有利于区分阳性和假阳性斑点。

10. 为确证阳性斑点的形成是由于细胞新合成的抗体，在蛋白质合成抑制剂存在的条件下，重复上述实验，此时 80%～100% 的阳性斑点应被抑制。

备选方案　用 ELISPOT 检测仪检测分泌抗体的细胞

附加材料（其他材料见基本方案）

硝酸纤维素膜（Millipore）
96 孔ELISPOT 检测仪（Schleicher & Schuell），Bio-Dot（Bio-Rad），或替代设备（图 8.11.2）
100mm 培养皿或 96 孔板盖（或替代品）
显微镜和载玻片

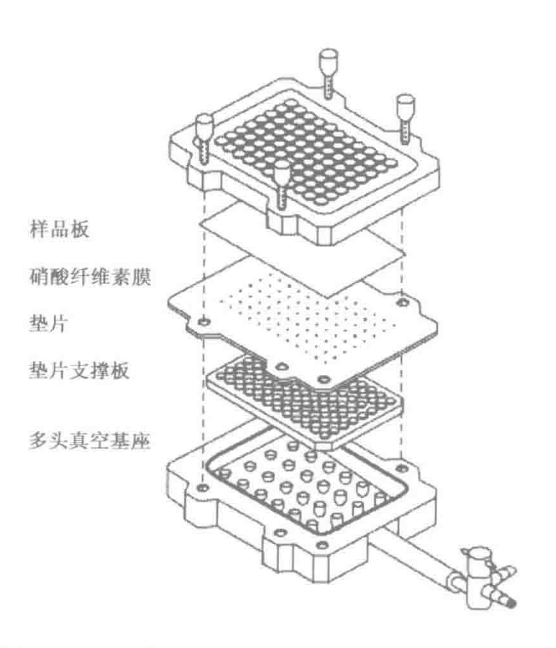


图 8.11.2　96 孔 ELISPOT 检测仪使用示意图，图示硝酸纤维素膜覆盖 96 孔。摘自 Bio-Rad 实验室。

1. 如图裁取合适大小的硝酸纤维素膜。按照需要，膜可裁剪成更小的几条，这样一次可检测最多 4 种不同的抗体分泌细胞。操作硝酸纤维素膜时应戴手套。
2. 将膜放入盛有抗原包被液的培养皿或 96 孔培养板盖中（液体量应足够覆盖膜），抗原用 PBS 稀释至合适浓度。室温孵育 30min。
3. 吸弃抗原包被液，用 PBS 将膜洗 3 遍。吸去残存的 PBS，加入 0.1%BSA/PBS，室温孵育 5min。此时浸泡在 PBS 中的膜可于 4℃保存几天。
4. 在膜的一角剪一缺口做标记。将膜安装在检测仪上。操作剪成小条的膜时，避免使用位于剪切边缘的孔，同时确保边缘处密封，防止孔间的渗漏和相互影响。
5. 用 PBS 调整待测细胞浓度为 10^4～10^7 个细胞/ml，置冰上备用。将不同稀释度的细胞悬液各 100μl 加入孔中，设 3 复孔。盖上 96 孔板盖，置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中孵育 3～4h（含抗生素时可孵育过夜）。
6. 轻轻拍干或吸净孔中的细胞培养基。将膜从检测仪卸下后，用 PBS 充分漂洗 3 遍，去除残存的细胞。
7. 用 0.1%BSA/PBS 稀释未标记的显色抗体或者标记的显色抗体至合适浓度，加入培养皿或 96 孔培养板盖中（液体量应足够覆盖膜），然后将膜浸没其中。室温孵育 2～3h 或 4℃孵育过夜。
8. 吸弃显色抗体，用 PBS 将膜洗 3 遍，去除残存的洗液。使用未标记的显色抗体或生物素标记的抗体时，继续将膜与酶标二抗或酶标抗生物素孵育一段时间，然后洗涤。
9. 在培养皿或培养板盖中，加入 HRP 或 AP 显色底物，液体量应足够覆盖膜。室温孵育显色（一般为几分钟，有时需 24h），此时，显微镜下可看见 ELISPOT 阳性斑点。
10. 用水将膜漂洗 2～3min，其间需更换漂洗用水。将膜固定在载玻片上，置低倍光镜下计数 ELISPOT 阳性斑点。
11. 在蛋白质合成抑制剂存在的条件下，重复上述实验（见基本方案，步骤 10）。

参考文献：Czerkinsky *et al.*，1988；Lycke，1986

撰 稿 人：Nils Y. Lycke and Richard Coico

单元 8.12　抗体的体内诱导和检测

基本方案 1　蛋白质或多糖抗原体内法诱导抗体的产生

材料

人外周血

类毒素混合物：25Lf U/ml 白喉类毒素（Connaught Laboratories 或 State Laboratoriy Institute of Massachusetts）与 10Lf U/ml 破伤风类毒素（State Laboratoriy Institute of Massachusetts）的混合物

多价肺炎球菌疫苗（如 Pneumovax 23、Merck 或 Pnu-Immune 23、Lederle）

皮下注射器和酒精棉球

1. 采集正常人外周血（附录 3G），血凝后，离心分离血清，－20～－70℃保存。

2. 用皮下注射器肌注（三头肌或大腿肌肉）0.5ml 类毒素混合物，注意避开血管。注射后 24h 内应密切观察，防止过敏反应的发生（尽管少见），出现情况及时处理。
3. 或者皮下注射 0.5ml 多价肺炎球菌疫苗。注射后应密切观察，出现情况及时处理（曾经接受疫苗注射的人发生过敏反应的概率增加）。
4. 免疫后第 1、2 和 3 周采血。若只采血一次，可在免疫后第 2 周采血。检测 IgM 时，应在免疫后第 3～7 天采血。分离血清后，血清置－20～－70℃保存。
5. ELISA 法检测样品中抗体的含量（见基本方案 2）。

基本方案 2　ELISA 法检测体内抗体的产生

材料（带√项目见附录 1）

√碳酸盐缓冲液，pH9.6 或 PBS（见相关手册）

抗原：白喉类毒素、破伤风类毒素、I 或 II 型肺炎球菌多糖或蛋白质偶联的 III 型肺炎球菌多糖（见辅助方案）

NaN_3，推荐使用

Tween/PBS：含 0.05%（V/V）Tween 20 的 PBS（4℃可储存 1 月）

含 1%（V/V）胎牛血清（fetal calf serum，FCS，56℃，1h 灭活）或含 0.1%（m/V）BSA 的 PBS，推荐使用

血清标准品和待测血清，避免反复冻融

FCS/Tween/PBS：含 0.1%FCS（56℃，1h 灭活）的 Tween/PBS

碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AP）标记的二抗：特异性针对人抗体的 κ 和 λ 轻链，以及抗人 IgG、IgA 和 IgE 抗体（Tago）

√底物，新鲜配制（每板需 6ml 左右）

3mol/L NaOH

破伤风类毒素和白喉类毒素标准品

96 孔平底培养板及盖子（Costar）

半自动或全自动洗板仪（Dynatech）

酶联仪

1. 取 96 孔板，预留第一列作为空白对照，在余下的每列中间隔（如第 2、4、6、8、10 列）加入 150μl 碳酸盐缓冲液（检测类毒素抗原）或 PBS（检测多糖抗原）。
2. 用碳酸盐缓冲液将白喉类毒素和破伤风类毒素分别稀释至 0.22Lf U/ml 和 0.56Lf U/ml；用 PBS 将 I/II 型肺炎球菌多糖和蛋白质偶联的 III 型肺炎球菌多糖分别稀释至 0.025mg/ml 和 1～3μg/ml。将稀释的抗原各取 150μl 加入上述剩余的各纵列孔中（如第 3、5、7、9、11 列），置 4℃孵育过夜。若加入 0.02%NaN_3后，培养板可保存 4 周。
3. 用半自动或全自动洗板仪洗板 3 次，每次加入 200μl Tween/PBS，洗板间隔 1～2min。最后拍干残余的洗液。
4. 备选操作：为降低非特异性结合，可加入 100～150μl 含 1%FCS 或 0.1%BSA 的 PBS。室温孵育 1h（或 4℃过夜），然后洗板（检测白喉类毒素和破伤风类毒素抗原

时不需此步骤)。

5. 将标准血清 3 倍系列稀释,制作标准曲线。方法如下:在第 2～3 列的第一排孔中加入 150μl 最高浓度的标准品(包括抗原包被孔和抗原未包被孔)。第 2～3 列余下的孔中加入 100μl FCS/Tween/PBS。用多道移液器从第一排的两孔中各吸取 50μl 血清分别加入第二排的对应两孔中,将血清进行 3 倍稀释。轻轻吹打混匀后,同上依次在第 2～3 列余下的各孔中进行血清 3 倍系列稀释。最后,从最末一排的两孔中各吸弃 50μl 稀释的血清(此时所有孔的终体积为 100μl)。
6. 将成对的待测血清(免疫前和免疫后)稀释后加到上述 96 孔板中。方法如下:在相应的 2 纵列(包括抗原包被列和抗原未包被列)最上面的两孔中,各加入 150μl 稀释后的待测血清(通常 1∶40,免疫后血清稀释度可更高些)。2 纵列余下的各孔中加入 100μl FCS/Tween/PBS。参照步骤 5 将待测血清进行 3 倍系列稀释。
7. 室温孵育 2h 或 4℃过夜。用 Tween/PBS 洗板 3 次,拍干残余的洗液。
8. 用 FCS/Tween/PBS 将 AP 标记的二抗稀释至合适浓度。用多道移液器在每孔中加入 100μl 抗体。第一列为空白对照,只加 FCS/Tween/PBS。室温孵育 2h 或 4℃过夜。
9. 加入 Tween/PBS 洗板 3 次,拍干残余的洗液。每孔中加入 100μl 新鲜配制的底物溶液,室温显色。酶联仪检测吸光值,待标准品最高浓度孔中的 A_{405} 吸光值达 1.0 时,在每孔中加入 100μl 3mol/L NaOH 终止显色。
10. 将数据输入计算机,进行处理和分析。分析结果时,应将样品孔的吸光值减去空白对照孔的吸光值。
11. 将待测样品的吸光值与标准品的吸光值进行比较。指定未稀释标准品的抗体效价为 1000 抗体单位,计算出样品的抗体单位。最好能将标准品对照国际白喉类毒素和破伤风类毒素标准品换算出国际标准值,然后计算样品值。

辅助方案　肺炎球菌多糖与蛋白质的偶联

III 型肺炎球菌多糖(和其他型肺炎球菌多糖,如 6A、9、14 和 19)需与蛋白质偶联后才能稳定地吸附于固相表面,从而获得重复性好的实验结果。此方法也可用于 I 和 II 型肺炎球菌多糖与蛋白质的偶联,此时,多糖抗原的剂量应减少 5～10 倍。

材料(带√项目见附录 1)

√指示液
　氰尿酰氯结晶
　0.1%(m/V)多聚赖氨酸(相对分子质量 30 000～70 000;Sigma)
　III 型肺炎球菌多糖
√PBS

1. 取 3 支试管,标记为 A、B 和 C。在 A 管中加入 0.5ml 指示液;在 B 管中加入 0.5mg 氰尿酰氯结晶;在 C 管中加入 0.1ml 0.1%(m/V)多聚赖氨酸。
2. 用水将肺炎球菌多糖抗原稀释至 1mg/ml。在 A 管中加入 0.1ml 稀释后抗原,混匀 10s(溶液呈粉红色)。将 A 管中的液体移入 B 管,混匀 10s(当 pH 降至 8.0～8.2

时，溶液变无色）。然后将 B 管中的液体移入 C 管。混匀后，4℃结合 2h。

3. 用 PBS 将肺炎球菌多糖抗原稀释至 2～5μg/ml（可获得 100μg 偶合抗原）。

撰稿人：Renata J. M. Engler，Carole C. Kuiman and David L. Nelson

单元 8.13 T 细胞杀伤功能的检测

注：除非特别说明，细胞均置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养。活细胞接触的所有试剂和器材应无菌。

基本方案 1 抗 CD3 诱导的 T 细胞杀伤实验

抗 CD3 抗体为 T 细胞多克隆活化剂。

材料（带√项目见附录 1）

靶细胞：EB 病毒（EBV）转化的 B 淋巴母细胞（ATCC：#1612；单元 8.16）

√RPMI-5 完全培养基

1mCi/ml Na_2［^{51}Cr］O_4（^{51}Cr≥300mCi/mg；Amersham）

T 细胞（效应性细胞）：单个核细胞、T 细胞或 T 细胞亚群（单元 8.3 或单元 7.2），来自正常非免疫个体

抗 CD3 抗体（IgG2a），由 OKT3 腹水或培养上清纯化（单元 1.5）或商品化试剂（Ortho Diagnostic 或 Becton Dickinson）

2%（V/V）Triton X-100

24 孔平底细胞培养板（Costar）

Sorvall 离心机及 H1000B 转子（或替代品）

96 孔圆底细胞培养板（Costar）

1. 在 24 孔板各孔中加入 5×10^5 EBV 转化的 B 细胞，补充 RPMI-5 完全培养基至 1.9ml。再加入 0.1ml ^{51}Cr（100μCi），37℃标记 18～24h。
2. 收集标记后的 B 细胞并加入离心管中。加入 10ml RPMI-5 完全培养基，室温，250*g* 离心 5min，洗涤细胞。台盼蓝拒染法计数活细胞（附录 3C）。用 RPMI-5 完全培养基，调整浓度至 5×10^3 个细胞/50μl（即 1×10^5 个细胞/ml）。
3. 从 1×10^5 个细胞/100μl 开始，用 RPMI-5 完全培养基，将效应性 T 细胞进行至少 4 个浓度的系列稀释，起始效应细胞：靶细胞（effector：target，E：T）为 20：1。
4. 从 4μg/ml 开始，用 RPMI-5 完全培养基，将抗 CD3 抗体进行至少 5 个浓度的 4 倍系列稀释。
5. 在 96 孔板各孔中，加入 50μl 放射标记的靶细胞、50μl 不同稀释度的抗 CD3 抗体和 100μl 不同稀释度的效应细胞，各组设 3 复孔。自发释放对照组只加入靶细胞（不加抗体及效应细胞）。使用单个核细胞进行实验时，应设置含靶细胞和效应细胞的对照组（不加抗体），即 NK 细胞杀伤活性对照组。在另一块 96 孔板中，设置最大释放对照组，其中加入 5×10^3 标记后靶细胞和 150μl 2% Triton X-100，也设 3 复孔。

250g 离心 2min 后，将培养板置培养箱孵育 4h。

6. 将培养板 200g 离心 5min。用移液器从各孔中吸取 100μl 上清，或用自动收集仪收集细胞培养上清。然后用 γ 液闪仪检测上清的 cpm 值。结果计算如下：

$$特异杀伤率\% = \frac{100\times(实验组-自发释放)}{最大释放-自发释放}$$

其中，自发释放为自发释放对照组的 cpm 值；实验组为待测孔 cpm 值；最大释放为含 Triton 孔的 cpm 值。确保自发释放 cpm 值≤25%最大释放值。使用单个核细胞实验时，实验组 cpm 值应减去无抗体组的 cpm 值以消除 NK 细胞的影响。

基本方案 2　抗原诱导的特异性 T 细胞杀伤功能的检测

附加材料（其他材料见基本方案 1）

合成的病毒抗原肽（推荐使用）

MEM 非必需氨基酸（JRH Bioscience）

含流感病毒的鸡胚尿囊液（HA 滴度 1∶128 或以上），无支原体污染（如 A/HK/；ATCC ＃VR544 或 A/JAP/305；ATCC ＃VR100）

含 5%（*V/V*）FBS 的 PBS（附录 1）

流感病毒免疫后志愿者特异性 T 细胞，间隔采血（单元 8.2 和 8.3）

6ml 细胞培养管（Falcon）

1. 将靶细胞（EBV 转化的 B 细胞）用 ^{51}Cr 标记（见基本方案 1，步骤 1）。或者，用合成的病毒抗原肽冲击 EBV 转化的 B 细胞。方法如下：在转化的 B 细胞中加入 1～10μg 合成肽，然后加入 ^{51}Cr，标记 18～24h 后直接进入步骤 4。
2. 将标记后的靶细胞加入 6ml 细胞培养管中（1×10^6～3×10^6 个细胞/管）。室温，250g，离心 5min，弃上清。加入 0.5ml 含 1×MEM 非必需氨基酸的 RPMI-5 完全培养基重悬细胞，再加入 0.1ml 病毒感染尿囊液。同时设置未感染尿囊液的阴性对照组。培养管置 37℃水浴 30min。
3. 加入 10ml 5%FBS。室温，250g 离心 5min，弃上清。用 5ml RPMI-5 重悬细胞。培养管置 37℃水浴 5h。
4. 加入 5ml 5%FBS。室温，250g 离心 5min，弃上清。用 1ml RPMI-5 重悬细胞。台盼蓝拒染法计数活细胞（附录 3C），用 RPMI-5 完全培养基调整细胞浓度至 5×10^3 个细胞/0.1ml。
5. 将效应性 T 细胞稀释后（见基本方案 1，步骤 3），进行杀伤功能检测。实验组和各对照组设置、上清收集及检测同前（见基本方案 1，步骤 5 和 6）。

参考文献：Kolber *et al.*，1988；Shearer *et al.*，1985

撰 稿 人：William E. Biddison，Rudolf Lichtenfels，Medi Asibzadeh and Roland Martin

单元 8.14　NK/LAK 细胞杀伤活性的检测

注： 活细胞接触的所有试剂和器材应无菌。

基本方案　^{51}Cr 释放法检测 NK/LAK 细胞杀伤活性

材料（带√项目见附录 1）

效应细胞：自然杀伤细胞（natural killer，NK）（单元 8.6）、淋巴因子活化的杀伤细胞（lymphokine-activated killer，LAK），或外周 PBMC（单元 8.1，按照附录 1，采用非连续 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离）

√RPMI-10 完全培养基，用于 NK 细胞培养

^{51}Cr 标记的靶细胞，用 RPMI-10 调整浓度为 5×10^4 个细胞/ml（见辅助方案）

含 5%（V/V）TritonX-100 的 PBS

10ml 圆底带盖聚丙烯塑料试管

96 孔圆底细胞培养板（Costar）

8 道移液器（如 Titertek、ICN Biomedicals）

Sorvall RT6000 离心机及 H1000B 转子（或替代品）

γ 液闪和配套试管

1. 台盼蓝拒染法测定效应细胞的活力（附录 3C）。将细胞悬液加入 10ml 圆底带盖聚丙烯塑料试管中，用 RPMI-10 培养基调整到合适浓度，以满足效应细胞：靶细胞(E：T)起始比率所需。如起始 E：T 为 50：1 时（对于 PBMC），效应细胞的浓度应为 2.5×10^6 个细胞/ml；起始 E：T 为 6：1 时（对于 LAK 细胞），效应细胞的浓度为 3.125×10^5 个细胞/ml（表 8.14.1）。

表 8.14.1　4h ^{51}Cr 释放法检测健康志愿者 PBMC 来源的 NK 细胞和 LAK 细胞的杀伤活性[a]

靶细胞	不同效/靶比时的杀伤百分率（均数±SD）							杀伤单位	杀伤单位	n
	50：1	25：1	12：1	6：1	3：1	1.5：1	0.75：1	(LU_{20}/10^7 个细胞)	范围[b]	
NK[c]	45±16	30±14	20±9	11±6				154±95	53～301	140
LAK[d]				57±14	44±13	30±12	18±9	1926±1244	669～3736	134

a. 缩写：LAK，淋巴因子活化的杀伤细胞；NK，自然杀伤细胞；LU_{20}，20%裂解时的裂解单位；n，例数；PBMC，外周血单个核细胞；SD，标准差。

b. 正常 50%～80%范围。

c. 新鲜分离的 PBMC 对 K562 靶细胞的杀伤活性。

d. PBMC 经 6000U/ml IL-2 体外培养 3d 后，对 Daudi 细胞的杀伤活性。

2. 轻轻混匀效应细胞，在 96 孔板 B 行的第 1～3 孔中各加入 200μl 效应细胞悬液（图 8.14.1）。同样将其他待测效应细胞悬液加入到 C～H 行的第 1～3 孔中。一块 96 孔板最多可同时检测 7 个样品。
3. 用 8 道移液器，在 B～H 行第 4～12 孔中各加入 100μl RPMI-10 培养基（图 8.14.1）。从 B～H 行第 1 列各孔中吸取 100μl 液体加到 B～H 行第 4 列对应各孔中，混匀。然后将第 4 列中的液体各取 100μl 加到第 7 列的对应孔中，混匀。继续将第 7 列各孔中的液体吸取 100μl 加入到第 10 列相应的各孔中，混匀。最后将第 10 列各孔中的液体吸弃 100μl。剩下的两列复孔重复上述操作，即将第 2 列各孔中的液体依次稀释到第 5、8 和 11 列；第 3 列各孔中的液体稀释到第 6、9 和 12 列。

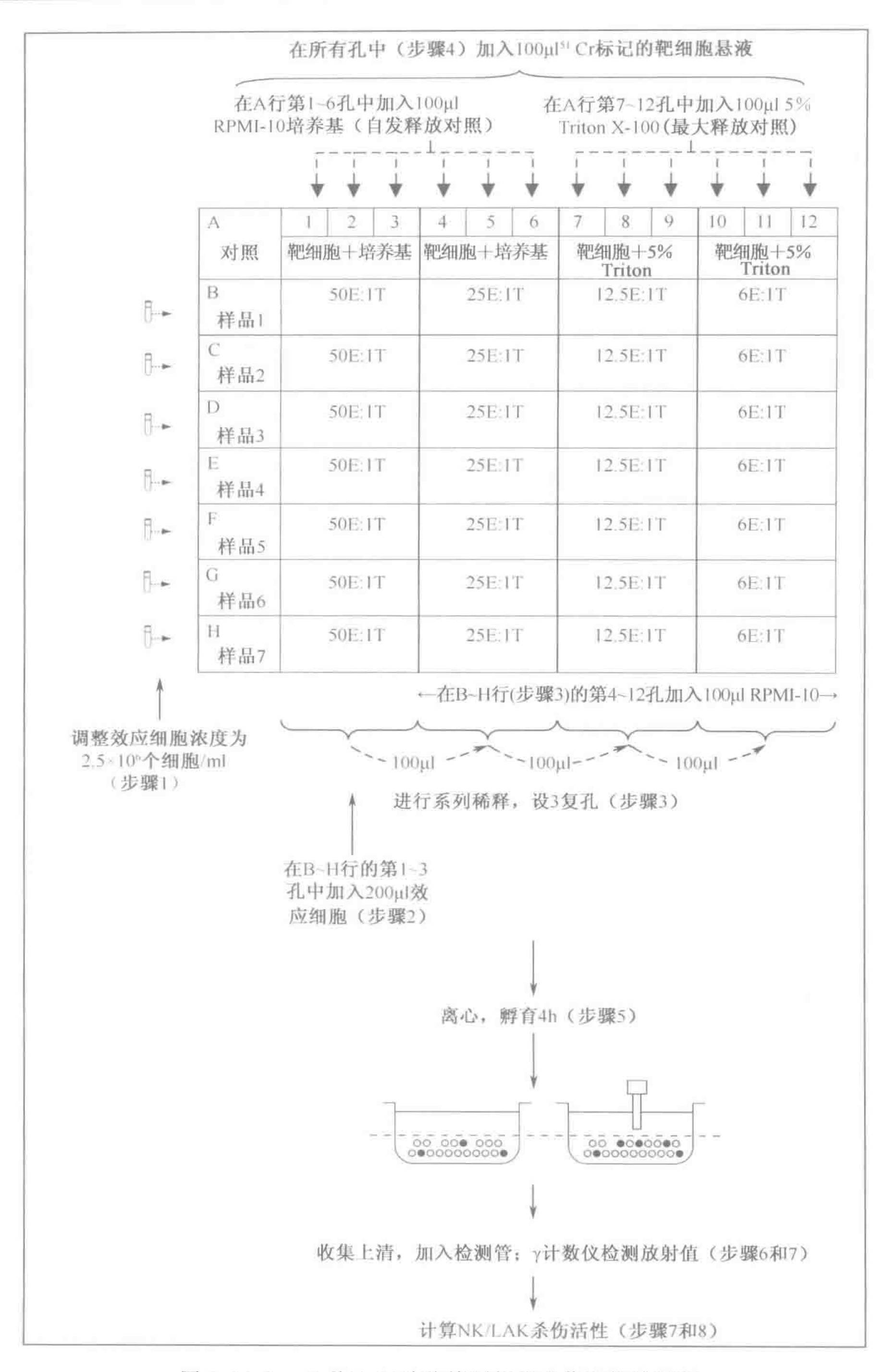


图 8.14.1　4h ^{51}Cr 释放法检测细胞杀伤活性流程图。

4. 用 RPMI-10 将^{51}Cr 标记的靶细胞调整为 5×10^4 个细胞/ml，在 A～H 行各孔中加入 100μl 靶细胞悬液。然后在 A 行第 1～6 孔中加入 100μl RPMI-10 培养基（自发释放对照组）；在 A 行第 7～12 孔中加入 100μl 5%Triton X-100（最大释放对照组）。

5. 室温，200g 离心 3min，缓慢减速。将培养板置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养 4h。培养时，避免将培养板互相叠放。
6. 用 8 道移液器小心吸取 50μl 或 100μl 培养上清加入相应的 γ 计数管中（此时也可采用自动收集系统）。
7. 用 γ 液闪仪检测各样品的 ^{51}Cr 放射值（包括对照孔和实验孔）。根据公式计算 NK/LAK 细胞特异杀伤百分率。

$$杀伤率\% = 100 \times \frac{实验孔平均\ cpm - 自发释放孔平均\ cpm}{最大释放孔平均\ cpm - 自发释放孔平均\ cpm}$$

8. 为比较不同效应细胞及不同 E：T 条件下的杀伤活性，结果可用杀伤单位表示（LU；如表 8.14.2）。一个 LU 代表杀伤一定百分比（如 20%）标准靶细胞所需的效应细胞数量。

表 8.14.2 头颈部肿瘤患者经 IL-2 治疗后，外周血 NK 细胞和 LAK 细胞杀伤活性的变化[a,b]

	细胞杀伤活性（$LU_{20}/10^7$ 个细胞）		例数	P 值
	IL-2 治疗前	IL-2 治疗后		
NK（杀伤 K562）[c]	100±12	158±12	26	0.005
LAK（杀伤 Daudi）[d]	1000±130	1995±150	23	0.0006
LAK（杀伤 SCCHN）[d]	316±23	631±50	20	0.015

a. 缩写：IL-2，白细胞介素 2；LAK，淋巴因子活化的杀伤细胞；NK，自然杀伤细胞；P，差异显著性水平；SCCHN，头颈部鳞状上皮癌。

b. 数据摘自 Whiteside 等，1993。

c. 新鲜分离 PBMC 的杀伤活性。

d. PBMC 经 6000U/ml IL-2 体外培养 3d 后的杀伤活性。

辅助方案 肿瘤靶细胞的制备和标记

检测 NK 细胞杀伤活性推荐用 K562 作为靶细胞，K562 为慢性骨髓瘤白血病细胞株（ATCC #243）。LAK 细胞杀伤活性检测推荐使用的靶细胞为 Daudi 细胞，Daudi 细胞是人 NK 细胞抵抗的 Burkit 淋巴瘤细胞株（ATCC #213）。这两种细胞均为悬浮细胞，细胞培养起始浓度为 2×10^5 个细胞/ml，应及时传代（如每 2～3d 传代），保持低密度培养，使细胞处于对数生长期（$<5\times10^5$ 个细胞/ml），密度过高时细胞易死亡。实验前一天，调整细胞浓度至 2×10^5 个细胞/ml。

其他靶细胞还包括贴壁生长的肿瘤细胞和手术新鲜分离的肿瘤细胞。冻存的肿瘤细胞复苏后也可用于 ^{51}Cr 标记，但细胞状态较差时，标记后的细胞可能会自发释放 ^{51}Cr。因此，标记前检测细胞活力，标记后充分洗涤尤为关键。

材料（带√项目见附录 1）

靶细胞，处于对数生长期

5mCi/ml $Na_2{}^{51}CrO_4$（ICN Biomedicals），1～2 周内使用

√RPMI-2 和 RPMI-10 完全培养基，用于 NK 细胞培养

15ml 锥底聚丙烯离心管

Sorvall RT 6000 离心机及 H 1000B 转子（或替代品）
1ml 注射器及 25G 针头
^{51}Cr 衰变表
γ 液闪仪和闪烁管

1. 实验当天，用台盼蓝拒染法检测靶细胞的活力（附录 3C；活细胞应≥70%），在 15ml 锥底聚丙烯离心管中加入 $2\times10^6\sim10\times10^6$ 个活细胞。室温，200*g* 离心 5min，弃上清。
2. 1ml 注射器装上 25G 针头，将 100μCi 的 $Na_2{}^{51}CrO_4$（浓度为 5mCi/ml）加入细胞中。根据 ^{51}Cr 衰变表调整同位素用量。
3. 轻轻混匀细胞，置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱标记 1h。每隔 15min 轻轻混匀细胞。加入 10ml RPMI-2 培养基，200*g* 离心 5min，洗涤细胞 2 次，注意：此时洗涤液应倒入同位素专用收集罐中。最后用 10ml RPMI-10 培养基重悬细胞。
4. 台盼蓝拒染法计数活细胞，调整细胞浓度至 5×10^4 个细胞/ml，取 0.1ml 标记后细胞加入 γ 液闪管中，用 γ 液闪仪检测靶细胞的放射活性。其 cpm 值一般为 0.2～1.5。

参考文献：Grimm *et al*.，1982；Ortaldo *et al*.，1986；Whiteside *et al*.，1993
撰 稿 人：Theresa L. Whiteside

单元 8.15　人 T 细胞的克隆和扩增

注：用照射灭活后的细胞进行实验时，应设置只含灭活细胞的对照组，以检验细胞的灭活效果。根据实验情况，可增加照射强度。此外还应常规监测细胞培养中是否有支原体污染，后者对实验结果影响很大。

注：如未特殊说明，细胞均置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养。活细胞接触的所有试剂和器材应无菌。

基本方案 1　抗原特异性 T 细胞的诱导

材料（带√项目见附录 1）

用可溶性抗原诱导特异性自体 T 细胞克隆时：
- 外周血单个核细胞（PBMC；单元 8.1），来自抗原致敏的个体，作为反应细胞
- 待测抗原（抗原或抗原肽）
- 照射灭活的自体或 HLA 匹配的同种异体 PBMC，用作抗原呈递细胞
- EBV 转化的自体 B 细胞（EBV-B 细胞；单元 8.16），用作已知抗原的抗原呈递细胞

特异性同种异体 T 细胞克隆时：
- PBMC，来自健康志愿者，作为反应细胞
- 照射灭活的同种异体 PBMC 或同种异体 EBV-B 细胞，作为刺激细胞

√T 细胞培养基

^{3}H TdR(推荐使用)

√PBS（无 Ca^{2+} 及 Mg^{2+}；推荐使用）

0.05%（V/V）戊二醛，PBS 配制

24 孔细胞培养板（Linbro；Hampton Research）

96 孔圆底细胞培养板（Becton Dickinson Labware）

15ml 和 50ml 离心管（Becton Dickinson Labware）

1a. 诱导特异性自体 T 细胞时：Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离 PBMC（单元 8.1），在 24 孔细胞培养板中加入 10^6 PBMC，然后加入不同浓度的抗原肽或可溶性抗原（0.1～10μg/ml），培养基总体积 1ml。

1b. 诱导特异性同种异体 T 细胞时：用 10^6 照射灭活（40Gy）的同种异体 PBMC 或 2×10^5 照射灭活（50Gy）的同种异体 EBV-B 细胞刺激 10^6 PBMC（反应细胞）。其中，刺激细胞与反应细胞的 HLA I 类或 HLA II 类抗原（分别用于 $CD8^+$ 或 $CD4^+$ T 细胞的克隆）应不相容。

2. 细胞置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 10d，其间不需补充培养基和生长因子。

3. 推荐操作：可在培养第 5 天各取 100μl 细胞悬液加入 96 孔培养板中，评估反应性 T 细胞的增殖能力，每组设 2～3 复孔。加入 1μCi（37kBq）^{3}H TdR，掺入 4h 后，用 γ 液闪仪检测 cpm 值（单元 8.8）。检测特异性同种异体 T 细胞的杀伤活性时，应采用 ^{51}Cr 释放法（单元 8.14）。

4. 培养第 10 天，收集细胞（应全部为 T 细胞），然后洗涤并计数（附录 3A）。

5a. 特异性自体 T 细胞：在 24 孔细胞培养板中，加入 10^6 上述激活的 T 细胞，再加入适当浓度的抗原或抗原肽进行二次刺激，此时应同时加入 10^6 照射灭活（40Gy）的自体 PBMC 或 EBV-B 细胞，培养基总体积 1ml。

5b. 特异性同种异体 T 细胞：用 10^6 照射灭活（40Gy）的同种异体 PBMC 或 EBV-B 细胞（50Gy），对 10^6 T 细胞进行二次刺激，细胞培养条件同初次刺激（步骤 1b）。

EBV-B 细胞表达高水平的 HLA I 类或 HLA II 类抗原，此细胞非常适合用于抗原肽的呈递；但是呈递原始抗原的能力较差。

EBV-B 细胞也可用戊二醛固定，方法如下：对于可溶性抗原，将 EBV-B 细胞与 1～10μg/ml 抗原肽预孵育 4～24h。PBS 洗涤细胞 2 遍，然后在 15ml 离心管中将 10^7 个细胞重悬于 1ml PBS 中。加入 1ml 0.05%戊二醛（PBS 配制），室温固定 30s。加入 2ml PBS，孵育 10min。PBS 洗涤细胞 2 遍，然后用培养基洗涤 1 遍即可。对于同种异体抗原，戊二醛固定的 EBV-B 细胞不需用抗原肽预处理。

6. 二次刺激后 5～7d 收集细胞，用培养基将细胞洗涤 1 遍，然后计数。按步骤 2 培养细胞并进行下一轮刺激，或者直接进行 T 细胞克隆（见辅助方案 1；图 8.15.1）。

基本方案 2　Th1 或 Th2 细胞的诱导

材料（带√项目见附录 1）

人脐带血或新鲜分离的 PBMC（单元 8.1）

抗体(如需要)：抗 CD8、抗 CD14、抗 CD20、抗 CD56、抗血型糖蛋白和（或）抗

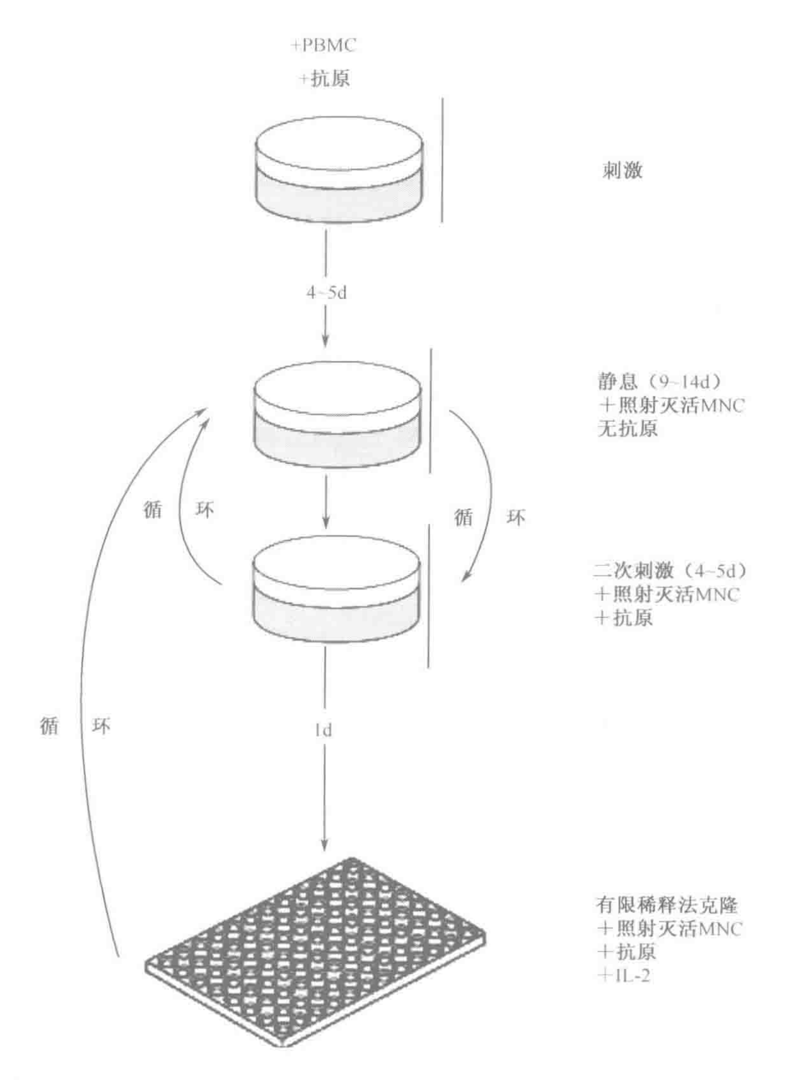


图 8.15.1 抗原特异性 T 细胞的诱导。MNC，单个核细胞；PBMC，外周血单个核细胞。

CD45RO^{+} 单抗

DNase（推荐使用）

小鼠纤维母细胞（L 细胞）：CD32（FcγRII）、CD58 和 CD80 cDNA 共转染后，照射灭活（40Gy）

IMDM，含 10%FBS，0.1μm 滤器过滤除菌

抗 CD3 单抗及抗 CD28 单抗（OKT-3、UCHT-1、9.3、L293 或类似抗体）

诱导 Th1 细胞时：rIL-2、rIL-12（Pepro Tech，R&D Systems）及抗 IL-4 中和抗体（R&D Systems，Pharmingen）

诱导 Th2 细胞时：rIL-2、rIL-4（Pepro Tech，R&D Systems）、抗 IL-12 中和抗体及抗 IFN-γ 中和抗体（R&D Systems，Pharmingen）

50ml 肝素抗凝管（用于收集脐带血）

24 孔细胞培养板

1. 将人脐带血加入到 50ml 肝素抗凝管中，Ficoll-Hypaque 密度梯度法离心分离单个核细胞（mononuclear cell，MNC）（单元 8.1）。或者，采用新鲜分离的 PBMC。磁珠法阴性分离脐带血 $CD4^+$ T 细胞或者外周血 $CD4^+$、$CD45RA^+$ T 细胞，所用抗体为抗 CD8、抗 CD14、抗 CD20 和抗 CD56 单克隆抗体（一般情况下，10^6 个细胞需用 1μg 抗体，单元 8.3）。用抗血型糖蛋白单抗去除 MNC 中的红细胞。外周血 PBMC 分离 $CD4^+$、$CD45RA^+$ T 细胞时，还应加入抗 $CD45RO^+$ 单克隆抗体。脐带血 $CD4^+$ T 细胞若需 4℃储存过夜，应加入 1μg/ml DNase。
2. 在 24 孔细胞培养板中加入 5×10^3 照射灭活的（40Gy）且表达 CD32、CD58 和 CD80 的 L 细胞（L 细胞用 10%FBS/IMDM 培养）。再加入抗 CD3 抗体使终浓度为 1μg/ml，置 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中培养 2～3h。
3. 吸弃悬浮细胞，贴壁细胞用 0.5ml 10%FBS/IMDM 洗涤一次。如下所示，加入 10^5 脐带血 $CD4^+$ T 细胞或 $CD4^+$、$CD45RA^+$ T 细胞及相应的细胞因子及中和性抗体，培养基终体积为 1ml。
   a. 诱导 Th1 细胞时：加入相应终浓度的 10ng/ml rIL-2、1ng/ml rIL-12 和 10μg/ml 抗 IL-4 中和抗体。
   b. 诱导 Th2 细胞时：加入相应终浓度的 10ng/ml rIL-2、20ng/ml rIL-4、10μg/ml 抗 IL-12 中和抗体及 10μg/ml 抗 IFN-γ 中和抗体。
4. 3d 后，加入 0.5ml 含 4ng/ml rIL-2 的培养基。以后根据细胞生长情况，用含4ng/ml rIL-2 的培养基传代。
5. 培养第 6 天，收集细胞，用 10%FBS/IMDM 洗涤细胞一次后，进行二次刺激（步骤 2～4）。
6. 二次刺激后第 6 天，收集细胞，检测上清中细胞因子分泌谱。方法如下：在包被有抗 CD3 单抗和抗 CD28 单抗的 24 孔板中加入 10^6 个细胞，再加入终浓度为 2ng/ml 的 rIL-2，培养基总体积 1ml。24～48h 后收集细胞培养上清，ELISA 检测上清中细胞因子的水平（单元 8.10）。胞内染色（单元 5.8）和 ELISPOT 检测（单元 8.11）时，将 24 孔细胞培养板 190g 离心 2min，继续培养 6h 后收集细胞。ELISPOT 检测时，轻轻收集细胞，加到硝酸纤维素孔中培养 18h。佛波酯和钙离子载体不影响 TCR/CD3 受体复合物介导的细胞活化，可诱导分泌 Th0 样细胞因子谱，因此可作为对照刺激。

细胞在第 1 轮刺激后扩增 10～20 倍，在第 2 轮刺激后扩增 6～10 倍。通常，第 3 轮刺激并不能诱导细胞继续扩增。

在 rIL-12 存在的条件下，第 1 轮刺激后，初始型 $CD4^+$ T 细胞迅速分化为分泌 IFN-γ 的 Th1 细胞。在 rIL-4 存在的条件下，细胞至少需经过两轮刺激才能有效诱导 Th2 细胞。二轮刺激后，Th1 细胞分泌的细胞因子水平为：IFN-γ，3～5ng/(ml · 10^6 个细胞)；Th2 细胞分泌的细胞因子水平为：IL-4，<3ng/(ml · 10^6 个细胞)；IL-5，<3ng/(ml · 10^6 个细胞)；IL-10，50ng/(ml · 10^6 个细胞)。

辅助方案 1　T 细胞的克隆

本方法可在无流式细胞分选仪的情况下使用。

材料

PBMC（最好来自两名以上健康志愿者），照射灭活（40Gy），洗涤备用
EBV-B 细胞，照射灭活（50Gy），洗涤备用（克隆抗原特异性同种异体 T 细胞时，选用表达相应 HLA I 或 HLA II 类抗原的细胞株）
植物血凝素（phytohemagglutinin，PHA；Murex）或抗 CD3 单抗
待克隆的 T 细胞（见基本方案 1）及相应的培养基
rIL-2（活性 10^7U/ml；Pepro Tech，R&D Systems）
2×饲养细胞混悬液（见辅助方案 2）
15ml 和 50ml 试管
96 孔圆底细胞培养板
24 孔细胞培养板

1. 如下所示准备 2×饲养细胞混合物：
   5×10^5照射灭活的同种异体 PBMC
   5×10^4照射灭活的 EBV-B 细胞
   0.2μg/ml PHA 或 1μg/ml 抗 CD3 单抗。
   冰浴备用。
2. 收集待克隆的 T 细胞，洗涤 1 次后，加入培养基调整浓度为 1×10^5个细胞/ml（附录 3A）。
3. 将上述饲养细胞悬液预热至 37℃后，在 15ml 试管中，用饲养细胞悬液作为稀释液，将 T 细胞稀释至 10^4个细胞/ml、10^3个细胞/ml 和 10^2个细胞/ml（图 8.15.1）。
4. 将上述不同浓度的细胞悬液各 100μl，加入 96 孔圆底培养板中（各浓度 5～10 复孔）。如果培养 5～7d 后，孔中仍无细胞生长，应重新开始实验。
5. 在 50ml 试管中，将细胞从 100 个细胞/ml 开始进行系列稀释（10、3 和 1 个细胞/ml），然后各取 100μl 加入 96 孔培养板中（各浓度 5～10 复孔）。将培养板置细胞培养箱中培养。
6. 5d 后，每孔加入 100μl 含 4ng/ml rIL-2 的培养基。当个别孔培养基变为黄色时，更换新鲜的含 4ng/ml rIL-2 的培养基 100μl。
7. 10～14d 后，各取 100μl 上清加入 96 孔板中，检测不同 T 细胞克隆培养上清中细胞因子的水平（单元 5.1、5.7 和 8.8）。
8. 挑选合适的阳性 T 细胞克隆转入 24 孔细胞培养板中，培养基总体积 0.5ml，再加入 0.5ml 2×饲养细胞混合物悬液进行细胞扩增。

辅助方案 2　克隆后 T 细胞的扩增

新鲜克隆的 T 细胞应尽量扩增然后早期冻存（见辅助方案 3）。所需材料见辅助方案 1。

1. 如下所示准备 2×饲养细胞混合物：

   2×10^6个细胞/ml 照射灭活（40Gy）的 PBMC

   2×10^5个细胞/ml 照射灭活（50Gy）的 EBV-B 细胞（应表达制备该 T 细胞克隆时的同种异体抗原）

   100ng/ml PHA。

   4℃保存备用。
2. 收集 T 细胞（见辅助方案 1），洗涤后，用培养基调整浓度为 4×10^5个细胞/ml。如果死细胞较多，用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法重新分离后进行实验（单元 8.1）。
3. 取 0.5ml T 细胞悬液加入 24 孔培养板中，再加入 0.5ml 2×饲养细胞混悬液，然后置细胞培养箱中培养。
4. 3～4d 后，用含 10ng/ml rIL-2 的培养基将细胞传代扩增。必要时，第 7～10 天再用含 2ng/ml rIL-2 的培养基继续扩增。根据情况，此时可将细胞冻存（见辅助方案 3）。整个培养期间，T 细胞密度应维持在 5×10^5～1×10^6个细胞/ml。
5. 当 T 细胞体积变小进入静息期时（通常在 10～14d），从步骤 1 开始重新扩增细胞。

辅助方案 3　T 细胞克隆的冻存

注： 如未特殊说明，所有操作均置冰上进行。

材料（带√项目见附录 1）

T 细胞克隆，饲养细胞混合悬液刺激后 7～10d（见辅助方案 2）
RPMI-1640 或其他不含 HEPES 的培养基，4℃备用
人或牛血清
二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO；Sigma）
√PBS，4℃备用
√T 细胞培养基
15ml 离心管
冻存管（Corning 或 Nunc）
细胞冻存盒（Nalgene）
2ml 吸管

1. 将 T 细胞加入 15ml 离心管中，4℃，190*g* 离心 7min。用含 10%人或牛血清的 RPMI-1640 培养基重悬细胞，调整浓度为 2×10^6～2×10^8个细胞/ml，置冰上备用。
2. 用预冷的 10%血清/RPMI-1640 培养基配制含 20%（*V/V*）DMSO 的冻存液（新鲜配制），置冰上 5min。注意：应将 DMSO 加到培养基中，而不是相反的顺序。
3. 在 2～3min 时间内，将等体积的 20%DMSO 冻存液逐滴加到待冻存细胞悬液中，同时轻摇试管混匀。然后将细胞悬液按每份 1ml（10^6～10^8个细胞）加入冻存管中，冻存管先放入细胞冻存盒中－80℃过夜，然后转入液氮中长期保存。
4. T 细胞复苏时，将冻存管（含待复苏的细胞）置 37℃水浴中。待细胞悬液融化后，将细胞转入 15ml 离心管中并置冰上。在 2～3min 内，逐滴缓慢加入 2ml 预冷的 PBS，速度宜慢，同时轻摇混匀细胞。然后用 2ml 吸管将 2ml 人血清或胎牛血清加

至细胞悬液底部。

5. 细胞经室温，190*g* 离心 5min，弃上清。用培养基洗涤细胞后，细胞即可用于后续实验或培养。

参考文献：Spits *et al.*，1982；Yssel *et al.*，1984

撰 稿 人：Hans Yeesl and Hergen Spits

单元 8.16　制备 EBV 转化的 B 细胞

基本方案

警告： EB 病毒（Epstein Barr virus，EBV）可能具有致病性。只有 EBV 抗体阳性的人员才能进行此病毒的相关操作。此外，研究发现 EBV 与多种淋巴细胞增生性疾病相关。

注： 如未特殊说明，细胞均置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养。活细胞接触的所有试剂和器材应无菌。

材料（带√项目见附录 1）

√RPMI-10 完全培养基
B95-8 细胞（绒猴细胞株；ATCC #CRL 1612），对数生长期
外周肝素抗凝血（附录 3G），扁桃体、脾脏细胞或骨髓
√PBS
√Ficoll-Hypaque 溶液
√HBSS
1mg/ml 环孢素 A，100%（*V/V*）乙醇配制，－20℃保存
Beckman 4℃离心机及 JS4.2 转子（或替代品）
0.45μm 滤器
50ml 锥底离心管
$25cm^2$ 细胞培养瓶

1. 将 1×10^6 个细胞/ml 对数生长期的 B95-8 细胞接种到 RPMI-10 完全培养基中。置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养 3d。确保活细胞>90%（附录 3C）。
2. 细胞经 4℃，300*g* 离心 10min 后，分离含 EBV 的上清（$>10^2\sim10^3$ 转化单位/ml）。上清经 0.45μm 滤器过滤除菌，分装，－130℃可保存 1 年或更长时间。最好对病毒上清进行滴定检测（Miller and Lipman，1973）。
3. 用 PBS 将约 15ml 外周肝素抗凝血进行 1∶2 稀释。使用扁桃体或脾脏细胞时，需制备单细胞悬液（单元 7.8），用 RPMI-10 完全培养基调整浓度为 $5\times10^6\sim1\times10^7$ 个细胞/ml。使用骨髓细胞时，用 RPMI-10 完全培养基将骨髓细胞 1∶20（*V/V*）稀释。
4. 在 50ml 锥底离心管中，将 12ml 稀释后的血液样品（或细胞悬液、骨髓）轻轻叠加到 12ml Ficoll-Hypaque 分离液上。室温，1500*g* 离心 8min，吸取界面层细胞，加入

50ml 锥底离心管中。

5. 加入适量 PBS，室温，300*g* 离心 15min，弃上清。用 HBSS 重悬细胞，300*g* 离心 10min，弃上清。细胞用 HBSS 再洗涤 1 遍，加入 2～5ml RPMI-10 完全培养基重悬细胞并计数（附录 3A）。
6. 在 50ml 锥底离心管中加入 10^7 个单个核细胞，总体积 2.5ml。然后加入 2.5ml 步骤 2 中的病毒上清。37℃水浴 2h。
7. 加入 5ml 含 1μg/ml 环胞素 A 的 RPMI-10 完全培养基。然后将细胞悬液（约 10ml）移入 $25cm^2$ 细胞培养瓶中。置 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养 3 周。培养期间在相差显微镜下观察 B 细胞转化情况（3 周左右时，细胞体积变大，聚集形成集落）。
8. 3 周后，混匀细胞，取 5ml 细胞悬液加入新的 $25cm^2$ 细胞培养瓶中。每瓶再加入 5ml RPMI-10 完全培养基，培养 1 周。此时可将细胞 −130℃冻存，或每周用 RPMI-10 完全培养基将细胞按 1∶3 传代培养。

参考文献：Rickinson *et al.*，1979；Tosato *et al.*，1982

撰 稿 人：Giovanna Tosato

单元 8.17　分离人肠黏膜单个核细胞

注：所有与活细胞接触的试剂和仪器必须无菌。

基本方案　分离人肠黏膜单个核细胞

材料（带√项目见附录 1）

新鲜的大肠或小肠样本，外科手术后分离获得
√HBSS，不含钙和镁，pH7.2
DTT-HBSS 溶液：75mg DTT 溶于 50ml HBSS，新鲜配制
√EDTA-HBSS 溶液
√消化酶溶液，新鲜配制
√RPMI-10 完全培养基
√Ficoll 分离液，密度为 1.076～1.078g/ml
√30%Percoll 溶液
一次性 250ml 有旋盖平底塑料容器、弯头镊和弯头眼科剪
100mm 和 50mm 塑料培养皿
5cm 磁性搅拌子，有菌或无菌
磁性搅拌器，室温和 37℃
光学显微镜
250ml 一次性带旋盖的埃伦迈尔烧瓶，无菌
外科无菌手套
10cm 无菌玻璃漏斗

50ml 无菌锥形底离心管

聚苯乙烯环（5cm 直径，1cm 高度）

Nitex 滤网（100 目；Tetko），剪成 10cm 方形大小

1. 用冷的自来水彻底冲洗外科分离的大肠或小肠样品，以除去血和管腔内容物，沿管腔垂直剪开，肉眼观察黏膜。根据临床诊断、解剖定位、大小及形态学特征，切取合适的区域[来自乙状结肠切除术或者回肠切除术的样本，平均大小为（2～3)cm×(2～10)cm，重量约 10g]。如果获得的组织块过大，则将其切为大小均一的样本，分别处理。
2. 将切除的组织浸于 100ml HBSS 溶液中，放置在一次性 250ml 平底塑料容器内，迅速转移至实验室。
3. 用 100ml 新鲜的 HBSS 溶液冲洗样本，去除坏死组织和粪便。轻轻吸干黏膜表面水分，去除过多的黏液。再用 HBSS 清洗样本一遍。
4. 将组织平铺于纸上，黏膜面朝上。从样本的边缘用弯头镊轻轻地夹起黏膜。从提起的样本边缘开始用弯头剪剪开黏膜和肌肉层。如果可能，在环状褶的位置垂直切去肌肉，得到 5mm 长和宽的样本。肉眼检查样本以了解肌肉是否被完全清除。把黏膜片放到含有 100mm HBSS 的培养皿中。
5. 在含有新鲜 HBSS 的培养皿中彻底清洗黏膜片，清洗后将其移入含有 50ml DTT/HBSS 的 250ml 平底塑料容器内，旋上盖子。将容器置于搅拌器上，60r/min 室温搅拌 30min 以松解残余的黏膜和碎片（溶液会逐渐变为轻度混浊，并含有一些小的漂浮碎片）。
6. 取出黏膜碎片和搅拌子，放入含有新鲜 HBSS 的培养皿中清洗，并转移至另一含有 100ml EDTA/HBSS 的容器中。室温搅拌 90min，让溶液中的组织剧烈振动，使上皮细胞从基底膜脱落。
7. 根据情况，重复搅拌一次或两次，直到上皮细胞基本脱落。若在搅拌过程中溶液变得非常混浊，应及时更换。
8. 将黏膜片和搅拌子移至一含有 100ml HBSS 的新的容器中。30min 更换一次 HBSS 逐步清洗黏膜片直到洗液变得澄清（一般洗 2～6 次）。有些重度炎症组织样本可能出现一些不确定的情况，需要区分预期的脱落上皮细胞、继续脱落的细胞及碎片，以避免搅拌过度导致上皮细胞的丢失。若出现可疑物质，用显微镜仔细检查漂浮的物质。
9. 在无菌的含有 5ml 消化酶溶液的 50mm 的培养皿中用眼科剪剪碎黏膜片至 5mm 大小。将平皿内的物质全部倒入无菌的含有 100ml 消化酶溶液和磁性搅拌子的 250ml 埃伦迈尔烧瓶中。若黏膜片很大，用两个或更多的埃伦迈尔烧瓶。旋松瓶盖，置于磁性搅拌器上，37℃，60r/min 搅拌≥8h。
10. 戴上外科手套，将 10cm 直径的玻璃漏斗架于 50ml 锥形离心管上。在聚苯乙烯环下放置 $10cm^2$ 的 Nitex 滤网，使其牢固。若步骤 9 中用两个烧瓶，则需要两套独立的过滤设备。
11. 视上清的颜色和气味检查埃伦迈尔烧瓶中是否有细菌污染，若显微镜证实有污染则应重新制备样品。

12. 将埃伦迈尔烧瓶 45°角倾斜 30s 使组织碎片沉淀。将上清缓慢倒入滤器上。避免将组织倒入滤器以免堵塞。必要时可以更换离心管。若液体稠厚或含有过多碎片可以重复过滤（反复炎症肠黏膜取出大块样本时可见）。
13. 室温，400*g* 迅速离心，弃上清。用 RPMI-10 完全培养基重悬所有沉淀物（包括步骤 1 和步骤 9 获得的样品）。沉淀物往往较大而且由于红细胞污染会带有淡红色。
14. 计数细胞（附录 3A），并用台盼蓝拒染法了解细胞的活力（附录 3C）。注意细胞的密度、死细胞的比例、可能污染的上皮细胞及细胞团块的存在与否。若活细胞比例≤50%或存在许多团块（炎症样本可能出现），用尼龙柱过滤（见辅助方案）。
15. 将细胞悬液分成几个等份分别置于 50ml 离心管中（每份都需用 Ficoll 密度液进行分离，样品若有 60%～70%的细胞活性需要用 4～8 份梯度液进行分离），每一份都用 25ml 的 HBSS 稀释。
16. 缓慢加入 12ml 的 Ficoll 密度液（避免破坏液面），盖紧盖子，室温，2100*g* 离心5min。
17. 丢弃最上层的物质。液面交界处有一层细胞，白色松散状，比 PBMC 分离后更宽且分界不明显，用 5ml 移液管小心吸取交界层细胞加入新的 50ml 离心管，每两个梯度用一管。避免吸入下层的 Ficoll 密度液和管壁上细胞团块。
18. 在离心管中加满 HBSS，盖紧盖子，翻转混匀，室温，400*g* 离心 5min，弃上清。将所有沉淀物移入一个离心管内，重复离心。用 5～10ml RPMI-10 完全培养基重悬沉淀物。计数细胞，并用台盼蓝拒染法了解细胞的活力。
19. 可选：若最终的细胞悬液中含有>20%的死细胞，表示 Ficoll 分离液用量不足，或者分离前需用尼龙柱预过滤。为了获得更多的活细胞，可以将细胞分成几等份并加于 2～4 倍体积的 Percoll 上（单元 2.5），离心。对每份而言，在 50ml 离心管内，将 5ml 细胞悬液加于 20ml 30%的 Percoll 上，室温，400*g* 离心 20min。取底部沉淀的活细胞。
20. 立即使用细胞，或用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞，4℃暂时存放细胞（不能过夜）。

辅助方案　用尼龙毛过滤器去除死细胞

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

3 通管

√20ml 尼龙毛柱

1. 过滤前（见基本方案，步骤 14）将细胞转移至 50ml 离心管中（$\leqslant 2\times10^8$ 个细胞/柱）。加满 HBSS 重复颠倒混匀。去除大的细胞团块以防止过多细胞黏着从而堵塞尼龙柱。
2. 将 20ml 尼龙毛柱连于 3 通管并固定于直立的环架上。柱下接一新的 50ml 离心管收集细胞。
3. 打开 3 通管让细胞悬液有序进入尼龙柱，用 HBSS 洗柱子，若收集细胞的离心管已满可以更换，直到收集总体积达 100ml。应保持尼龙毛基质完全湿润。若流速很慢，用无菌 Pasteur 吸管搅拌柱的顶部（避免重悬整个柱内基质）。
4. 室温，400*g* 离心 5min。弃上清，用 HBSS 重悬沉淀物。调节体积以进行 Ficoll 分离（见基本方案，步骤 15）。

参考文献：Bull and Bookman，1977；Fiocchi，1985
撰 稿 人：Claudio Fiocchi and Kenneth R. Youngman

单元 8.18　人树突细胞分离和培养

注：除非另有说明，所有的孵育都应在 37℃，5%CO_2 细胞培养箱中进行。所有与活细胞接触的试剂和仪器都必须无菌。

基本方案 1　从外周单个核细胞中分离人树突细胞

材料（带√项目见附录 1）

≤24h 内获得的白细胞
√RPMI-10 完全培养基，室温和 37℃
RPMI-1640
√14.5%的甲泛葡胺溶液，室温
√PBS，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}，4℃
15ml 和 50ml 聚丙烯锥形底离心管
9in（23cm）巴氏吸管
Sorvall 离心机及 H1000B 转子（或替代转子）
100mm 细胞培养板
倒置显微镜

1. Ficoll 密度梯度分离法（或其他合适的方法）分离后的富含外周血单个核细胞的白膜层或单采的白细胞。台盼蓝计数活细胞（附录 3C，通常为 $6\times10^8\sim10\times10^8$ 个细胞）。若血小板污染严重，可用低速离心洗涤去除，用 RPMI-10 完全培养基调整细胞浓度为 $1\times10^7\sim2\times10^7$ 个细胞/ml。

   细胞分离过程中需要用细胞计数板计数细胞（附录 3A），确保没有大量单个核细胞的丢失。

2. 用 AET 处理的 SRBC 通过 E 玫瑰花环形成去除 T 细胞（单元 8.2），步骤如下：
   a. 在 50ml（非 15ml）管中加入 SRBC 和单个核细胞，冰浴 20min。
   b. Ficoll 离心用 Pasteur 吸管吸取交界层细胞至 50ml（非 15ml）锥形底离心管。用无血清 RPMI-1640 培养基（非 HBSS）4 倍体积稀释，室温，450*g* 离心 10min。弃上清并用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞。重复洗一次，然后调整细胞浓度为 1×10^7 个细胞/ml。

   通常，该步骤获得的 E 玫瑰花环阴性细胞数为 $3\times10^7\sim6\times10^7$ 个细胞（B 细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞）。

3. 将去除 T 细胞的单个核细胞铺于 10mm 细胞培养板中，每板 10ml（$\leq1\times10^8$ 个细胞）。37℃孵育过夜使单核细胞贴壁同时也使树突细胞进一步分化为成熟树突细胞。
4. 轻轻晃动培养板使未贴壁的细胞重悬，将未贴壁的细胞移入新的 100mm 细胞培养

板。用预热的培养基轻轻地洗涤培养板 3 次以获取残留的未贴壁细胞。重新孵育培养板 30min 去除多余的单核细胞，轻轻旋动培养板获取未贴壁细胞。若有需要可以重复一次。

5. 用相差显微镜检查培养板中剩下的细胞是否都为贴壁、扁平的单核细胞。若仍含有大量未贴壁细胞，则应重新洗板。
6. 室温，200*g* 离心去除 T 细胞和单个核细胞的剩余细胞，弃上清，用 RPMI-10 完全培养基重悬细胞。计数并调整细胞浓度为 1×10^7 个细胞/ml。
7. 室温下，在 15ml 锥形底离心管中加入 4ml 无菌 14.5%的碘葡酰胺溶液。另一管准备 8ml 细胞悬液。将 8ml 细胞悬液缓慢加在甲泛葡胺溶液上，形成一明显界面。室温，800*g* 离心 10min。缓慢加速离心。
8. 吸取顶部的培养基介质直到距离界面 0.5in（1cm）。用无菌 Pasteur 吸管小心收集液面交界处的细胞及顶部约 1ml 的甲泛葡胺。在分离过程中有可能导致细胞还残留于甲泛葡胺介质中。
9. 将细胞移入新的 50ml 锥形底离心管，用至少 2 倍体积的冰 PBS 稀释甲泛葡胺，轻轻混匀。
10. 450*g* 离心 10min。用 RPMI-10 完全培养基洗涤细胞两次，台盼蓝拒染法计数活细胞，用 RPMI-10 完全培养基重悬并调整浓度为 1×10^7 个细胞/ml。
11. 再次将细胞悬液铺于 100mm 细胞培养板上进一步去除树突细胞中的单核细胞，每板 10ml 悬液。37℃孵育 1h。轻轻晃动培养板，吸取含有未贴壁细胞的上清。光学显微镜法检查确保单核细胞被去除且没有过多的未贴壁树突细胞丢失。

    树突细胞体积较大，且有不规则的长突起，而淋巴细胞则小而圆。

12. 室温，450*g* 离心 5min，沉淀细胞。

    可获得 5×10^6～10×10^6 个细胞，其中含有 20%～80%树突细胞，一般没有淋巴细胞污染。

13. 可选：应用合适的抗体（表 8.18.1）免疫荧光标记，流式细胞仪分析树突细胞的纯度（单元 4.1 和 4.2）和形态学评估，或通过混合淋巴细胞反应（单元 8.8）进行细胞的功能研究。

表 8.18.1 单克隆抗体在人血树突细胞常规流式细胞分析中的应用

抗原[a]	最初表达的细胞类型	与树突细胞的反应性
MHC II 类	粒细胞	+++++
CD1c	胸腺细胞	++
CD33	单核细胞	++
CD40	B 淋巴细胞	+
CD83	树突细胞	++
CD86	抗原呈递细胞	++
CD3	T 淋巴细胞	无
CD14	单核细胞	无
CD19	B 淋巴细胞	无
CD56	NK 细胞	无

a. 所有列出的抗原除 CD83 外均为广泛使用的商品化的单克隆抗体；CD83 是从 Genzyme 获得（Zhou and Tedder，1995，1996）。单抗的反应性是由相对线性比例来检测，+++++表明抗原表达量最高。人血树突细胞至少需要 4 个标记：MHC II 类、CD83、CD3 和 CD14 来界定。

备选方案　免疫磁珠法分离树突细胞

附加材料（其他材料见基本方案 1）

混合的单抗包括抗 CD3、CD14、CD19 和 CD56（表 8.18.1），均为 10×饱和浓度
预洗的羊抗小鼠 IgG 包被的磁性微珠（Dynabeads）（单元 8.3）
抗 CD83 单抗（Genzyme），10×饱和浓度
摇床，4℃
磁性分离装置

1. 密度梯度离心从白细胞中分离单个核细胞（见基本方案 1，步骤 1）。计数并用 RPMI-10 完全培养基调整细胞浓度为 2×10^7 个细胞/ml，置于 15ml 锥形底聚丙烯离心管中。
2. 在单个核细胞悬液中加入 1/10 体积的 10×混合单抗，在振荡器上孵育 30min。4℃，6～10r/min 离心洗涤两次，用新鲜培养基重悬至 2×10^7 个细胞/ml，移入新的聚丙烯离心管中。
3. 加入 2ml 预洗的磁性微珠，4℃，6～10r/min 振荡 1h。用磁性分离装置分离磁珠包被的细胞（淋巴细胞，单核细胞和 NK 细胞），让磁珠或结合磁珠的细胞与磁性物质结合 5min（样本量大可以延长）。
4. 将未结合的细胞移入一新的离心管，并进行二次分离。计数细胞并用 RPMI-10 完全培养基重悬至 2×10^7 个细胞/ml。重复步骤 3 并重悬阴性细胞至 2×10^7 个细胞/ml。
5. 将单个核细胞悬液铺于 100mm 细胞培养板上，10ml 细胞悬液/板。37℃孵育过夜使单核细胞贴壁于培养板，并使树突细胞进一步分化成熟。
6. 轻轻晃动培养板使未贴壁细胞重悬，收集去除了单核细胞的单个核细胞至聚丙烯离心管。用 3ml 新鲜预热培养基再洗板一次收集未贴壁细胞，200*g* 室温 5min 沉淀细胞。
7. 弃上清，用 RPMI-10 完全重悬细胞。计数并调整浓度至 1×10^7 个细胞/ml。加入 1/10 体积的 10×抗 CD83 单抗，4℃，6～10r/min 振荡 30min。
8. 离心洗涤细胞两次，用新鲜培养基重悬至 1×10^7 个细胞/ml，并移入新的离心管。加入 1ml 预洗的磁珠，4℃，6～10r/min 振荡 1h。
9. 磁性装置分离磁珠包被的细胞。5min 后，移出未结合的细胞。
10. 用新鲜 RPMI-10 完全培养基彻底重悬结合的 $CD83^+$ 细胞，参考步骤 7 的终体积进行二次磁性分离。用新鲜培养基重悬获得的细胞。若有必要，可以进行第三次分离，然后计数细胞。去除磁性微珠，见单元 8.4，但通过 CD83 免疫磁珠分离树突细胞的产量很低。

用该方法分离的细胞常常在形态学表型上看是同质的，并表现出 DC 的形态学特征。

基本方案 2　用单核细胞诱导人树突细胞

因为单核细胞在数量上远远大于树突细胞，比起基本方案 1，这一方法不仅可以节省样本量还可以获得更多的目的细胞。

材料（带√项目见附录 1）

≤24h 内获得的白细胞

√RPMI-10 完全培养基，室温和 37℃

0.2mmol/L EDTA，溶于 PBS（附录 1），无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}

√14.5%的甲泛葡胺溶液，室温

√重组人 GM-CSF

√重组人 IL-4

√重组人 TNF-α

倒置相差显微镜

有棉花充填的 9in（23cm）Pasteur 吸量器

Sorvall 离心机及 H 1000B 转子（或替代转子）

15ml 聚丙烯锥形底离心管

细胞培养瓶

1. Ficoll 密度梯度离心法和贴壁法分离单个核细胞（单元 8.1 和 8.5）。
2. 小心吸取上清，并用预热的 RPMI-10 轻轻洗板去除未贴壁细胞。用倒置相差显微镜检查体积小的圆形淋巴细胞污染情况。若还存在淋巴细胞，则重新洗板，注意动作要轻柔。
3. 用塑料细胞刮轻柔刮取贴壁的单核细胞（单元 8.5）。或者，将细胞在含有 0.2mmol/L EDTA 的 PBS 中 4℃孵育 10min，用巴氏吸管吹洗贴壁的单核细胞，室温，450*g* 离心 5min，用含 0.2mmol/L EDTA 的 PBS 调整单核细胞密度 $<1\times10^7$ 个细胞/ml（附录 3A）。
4. 在含有 4ml 14.5%的甲泛葡胺溶液的 15ml 锥形底离心管中缓慢加入 8ml 细胞悬液。室温，800*g* 离心 10min，沉淀污染的淋巴细胞。吸取交界处的细胞并用含 0.2mmol/L EDTA 的 PBS 洗涤两次。若还存在淋巴细胞，可以重复用甲泛葡胺进行密度梯度离心。
5. 用少量 RPMI-10 重悬细胞并了解获取细胞的活力（附录 3C）。用含有 800U/ml 的 GM-CSF，500U/ml IL-4 的 RPMI-10 调整细胞浓度至 1×10^6 个细胞/ml。用合适大小的细胞培养瓶或其他容器培养。在培养的第 3 天，吸取 75%的上清（不要触及细胞），换入新的培养基和细胞因子。

   单核细胞在 GM-CSF 和 IL-4 的作用下可以诱导生成小的、有特征性的、半贴壁的细胞集落。第 5 天时细胞紧密聚集成团，只有少数细胞位于集落之间，并可以观察到某些树突细胞的表型。

6. 第 5 天，加入含有 100U/ml TNF-α、800U/ml GM-CSF、500U/ml IL-4 的 RPMI-10 培养基。到第 8 或 9 天用吸管吹吸，打开细胞团混匀细胞。

   此时的细胞大部分为 CD83 阳性的树突细胞，形成较大的集落。单核细胞来源的树突细胞，在形态上是一致的，并表现出树突细胞的细胞学特征和活力。

   最终获得的细胞 60%～90%为典型的树突细胞，并且大于 95%的为有活力的细胞。到第 14 或 15 天，当细胞的体积和集落继续增大，细胞就会开始分化为其他未知细胞。

7. 检测树突细胞的纯度（见基本方案 1，步骤 13）

参考文献：Thomas and Lipsky，1994；Zhou and Tedder，1995，1996
撰 稿 人：Thomas F. Tedder and Paul J. Jansen

单元 8.19　分离和鉴定人自然杀伤细胞亚群

本单元通过细胞表面表达的 CD56 分子（$CD56^{bright}$ 和 $CD56^{dim}$）描述了从正常人血中分离和鉴定人的 NK 细胞亚群。在正常人的 PBMC 中 $CD56^{bright}$ 和 $CD56^{dim}$ NK 细胞的比例变异范围大（1∶20～1∶5），有时甚至很难区分 $CD56^{bright}$ NK 细胞。为了去除某些含靶细胞的供者的样本，在分离前最好检测 NK 细胞的比例，以及 $CD56^{bright}$ 与 $CD56^{dim}$ NK 细胞的比值。

注：这一方案不能用于回输患者体内。

注：所有孵育都在饱和湿度、37℃，含 5%CO_2 培养箱中，除非另有说明。所有与活细胞直接接触的试剂和设备都必须无菌。

基本方案　从 PBMC 中分离人 NK 细胞

材料（带√项目见附录 1）

肝素钠
人外周血白细胞（附录 3G）。
混合抗体（富含人 NK 细胞，StemCell Technologies）
√PBS
RPMI-1640 培养基，室温和 4℃
√完全 RPMI-10AB 和 RPMI-30AB，室温和 4℃
√RBC 裂解液，室温
抗体，已经过滴定取得最佳工作浓度：
小鼠 IgG 荧光素偶联的同型对照抗体（Coulter）
抗人 CD56 荧光标记抗体（Coulter，NKH-1 克隆，最好用 PE 或 PE-Cy5 标记）
50ml 无菌、锥形底带有螺旋盖的聚丙烯离心管
Tabletop 转子（Adams Nutator，Fisher Scientific）
离心机（或同类离心机）
6 孔细胞培养皿
5ml 无菌聚丙烯或聚丙烯流式管（Fisher Scientific）
无菌细胞滤网（30～70μm，Fisher Scientific）
流式细胞分选仪（Coulter EPICS 系列，Becton-Dickinson FAC 系列，DakoCytomation Moflo，或同类仪器设备）

1. 标记 50ml 离心管，并在每管中加入 200μl 肝素钠。分离供者白细胞（1×10^7 PBMC/ml），静脉穿刺术后（1×10^6 PBMC/ml）的血分别加入 50ml 锥形离心管中（或一分为二分别加入两个离心管），将肝素钠混匀。为了避免交叉反应，将不同供者来源的

细胞分别纯化。

2. 在每 20ml 血中加入 2ml RosetteSep 抗 NK 细胞表面抗原的混合抗体。遵照 RosetteSep 混合抗体说明书。置于水平振荡器上室温振荡 30min。
3. 将 50ml 锥形离心管中的血分为 15ml 的几个等份，加入等体积的室温 PBS。盖紧盖子颠倒 3 或 4 次混匀。Ficoll 离心分离 NK 细胞（单元 8.1）。小心收集整个 NK 细胞层，该细胞看起来比起分离 PBMC 中的典型的单个核细胞层更小（T 细胞、B 细胞和单核细胞将位于红细胞层之下）。
4. 用等体积（或更大体积）的室温 PBS 或 RPMI-1640 洗涤收集的细胞，365*g* 离心 15min。用 5ml 室温的 RPMI-10AB 完全培养基重悬沉淀物，加入 40ml RBC 裂解液，室温振荡 5min。室温，230*g* 离心 5min。若红细胞仍存在可以重复裂解。
5. 用 5ml RPMI-10AB 完全培养基重悬细胞。计数并用台盼蓝拒染法检测细胞活力（附录 3C）。

   典型的白细胞分离浓缩血一般含有 300×10^6～500×10^6 个 NK 细胞。全血含有 1×10^6 个 PBMC/ml 及 1×10^5 个 NK 细胞/ml。单采白细胞的样品中 PBMC 的数量与个体差异有关。

6. 可选操作：用完全 RPMI-10AB 调整 NK 细胞浓度为 5×10^6 个细胞/ml，铺于 6 孔板。在 37℃，5%CO_2 培养箱中培养过夜（但不能超过 12～14h，且培养基中不应含细胞因子）。用 PBS 洗板收集细胞，室温，230～365*g* 离心 10min。用 5ml RPMI-10AB 培养基重悬沉淀物。计数细胞并用台盼蓝拒染法检测细胞活力。
7. 如上离心沉淀细胞，用 200ml RPMI-10AB 完全培养基重悬细胞。吸取 2×10^5 个细胞至 5ml 聚丙烯流式管用于标记同型对照抗体。将剩余的细胞移至几个 5ml 流式细胞管标记荧光直接偶联的抗 CD56 单抗。
8. 在每一流式管中加入合适的单抗，混匀后置于冰上 15～30min，每 10min 振荡一次。在孵育过程中，为每一份供者血细胞提供 30ml RPMI-30AB 完全培养基。
9. 用 RPMI-10AB 完全培养基洗细胞 3～4 次，同上离心。用 RPMI-10AB 完全培养基重悬抗 CD56 抗体标记的细胞为 15×10^6 个细胞/ml。用 500μl RPMI-10AB 完全培养基重悬对照抗体标记的细胞。
10. 用 30～70μm 无菌细胞滤器过滤细胞至冰上放置的新的 5ml 流式管以去除残渣和死细胞团。直接上流式细胞分选仪（单元 4.2）。对照抗体标记的细胞作为背景对照设置起始分选参数（单元 4.2），按照细胞表面的 CD56 密度分选细胞（图 8.19.1），收集所需的细胞至含有 1～2ml 的 RPMI-30AB 完全培养基（步骤 8）的离心管中，迅速铺板。

辅助方案　人 NK 细胞亚群的表型和功能分析

表型

人 NK 细胞亚群表达一系列细胞表面标记（表 8.19.1）。可以用流式细胞仪对 PBMC、富集的 NK 细胞或纯化的 NK 细胞分析 NK 细胞亚群的表型。流式细胞仪分析已在单元 4.2 中列出，特异性去除细胞因子受体计数也已在单元 5.9 中列出。在用流式细胞分析之前，抗体需要滴定以确保已经去除阳性和阴性细胞。

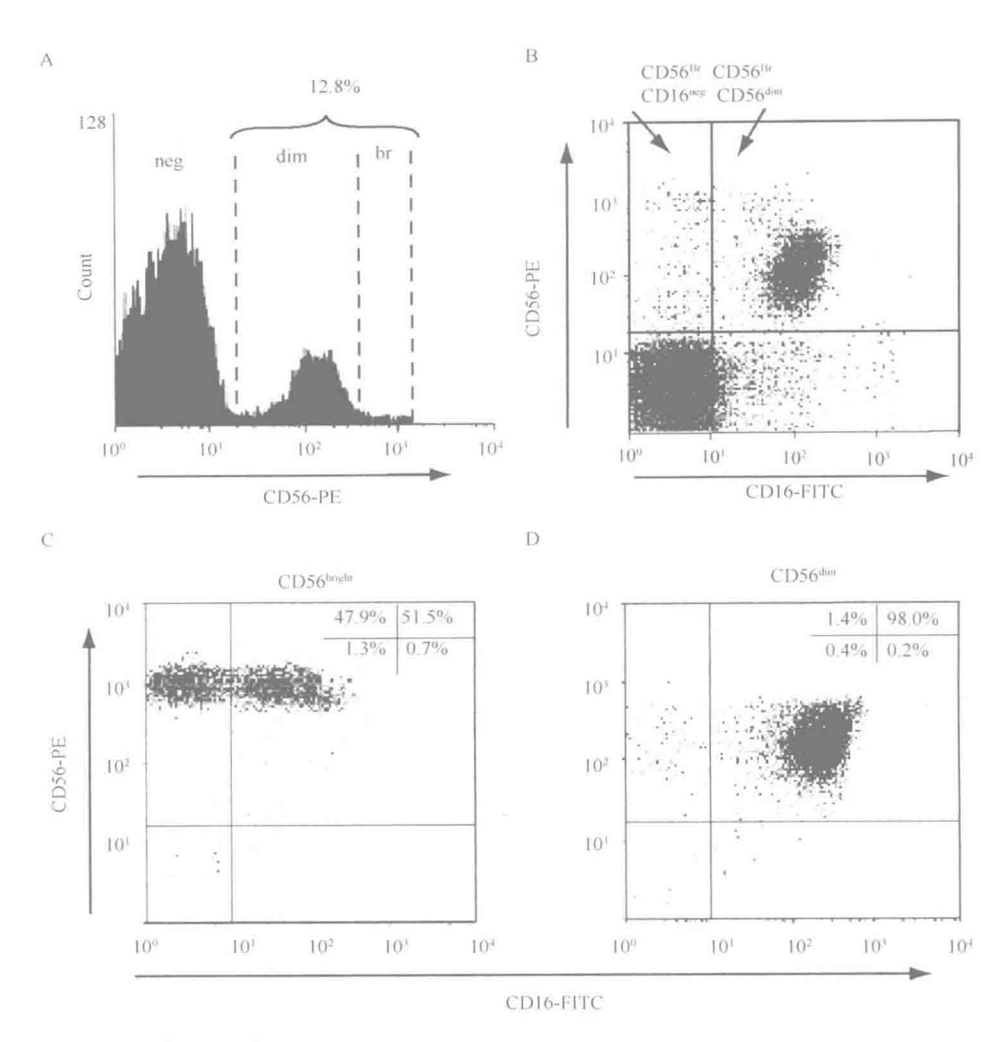


图 8.19.1　流式细胞从人血中分析和分选人 NK 细胞。A. 分析人外周血淋巴细胞（PBL）中 $CD56^{+}$ 细胞提示 NK 细胞代表了 10%～15%的 PBL。B. 用 CD56-PE、CD16-FITC 双标记分析表明接近所有 $CD56^{dim}$ 的 NK 细胞高表达 CD16Fc 受体。C 和 D. 经过富集和流式细胞仪纯化后，$CD56^{bright}$ 和 $CD56^{dim}$ NK 细胞亚群纯度≥98%，所有 $CD56^{dim}$ NK 细胞高表达 CD16，而只有 50%的 $CD56^{bright}$ NK 细胞低表达 CD16。经美国血液学协会允许从 Cooper 等（2001a）翻印。

表 8.19.1　人 NK 细胞亚群受体表达[a]

	$CD56^{bright}$	$CD56^{dim}$		$CD56^{bright}$	$CD56^{dim}$
CD56	++[b]	+[c]	**NK 受体**		
CD16	−/+[d]	++	ILT-2[f]	−[g]	+
NK 受体			**细胞因子和趋化因子受体**		
KIR[e]	−/+	++	IL-2Rαβγ	+	−
CD94	++	−/+	IL-2Rβγ	+	+
NKG2A	+	−/+	c-kit	+	−

续表

	CD56^bright	CD56^dim		CD56^bright	CD56^dim
细胞因子和趋化因子受体			**细胞因子和趋化因子受体**		
IL-1RAcP	+	+	CX3CR1	−	++
IL-1RI	+	−/+	**黏附分子**		
IL-18R	+[h]	−/+	CD2	++	+
CCR7	++	−	CD62L	++	−/+
CXCR3	+	−/+	PEN5/PSGL1	−	+
CXCR1	−	++	LFA-1	−/+	++

a. 经 Cooper 等（2001b）准许翻印。
b. 表示高密度表达。
c. 多数细胞表达。
d. 表达有差异性。
e. 杀伤性免疫球蛋白样受体（KIR）。
f. Ig 样转录物（ILT）。
g. 不表达。
h. IL-18R 表达在激活的 $CD56^{bright}$NK 细胞上调。

定量分析人 NK 细胞亚群细胞因子的产生

人 NK 细胞在特异性刺激后会产生多种细胞因子和趋化因子。刺激 NK 细胞使之分泌细胞因子的方法包括单核细胞和 T 细胞来源的细胞因子的活化（如 IL-1、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21），单克隆抗体与某一NK 细胞受体结合，以及利用非特异性活化剂如佛波酯（如 PMA）和离子霉素。细胞可以在 96 孔圆底培养板中培养，用完全 RPMI-10AB 调整细胞浓度为 $1\times10^5\sim5\times10^5$ 个细胞/ml，200μl/孔，置于 37℃，5% CO_2 细胞培养箱中培养。当使用新的刺激或未知活性的刺激时，需要设定剂量反应曲线以取得合适的 NK 细胞因子分泌浓度。活化静息的（之前活化过）NK 细胞使之产生细胞因子需要两个信号如细胞因子联合作用（如 IL-2 加上 IL-12）。因此，除了单因素活化外，需要尝试多种因子联合作用。NK 细胞在活化后 12h 就开始分泌细胞因子，24～48h 达到高峰，但细胞因子的转录产物在刺激后 1～3h 就可以检测到。

细胞因子和趋化因子产生可以用酶联免疫吸附试验（ELISA，商品化）和胞内标记流式细胞仪分析（单元 5.8），而转录产物可以用实时定量 RT-PCR 量化。ELISA 可以检测 NK 细胞培养上清中的细胞因子。ELISA 试剂盒和针对人细胞因子和趋化因子的相应的抗体都已经商品化。胞内标记流式细胞检测是分析单个细胞分泌细胞因子的快速和定量的方法，并且还可以提供分泌和不分泌细胞的表型特征，甚至可富集和分选 NK 细胞。另外，BD 公司提供的带有 Golgi Plug 的 Cytofix/Cytoperm 试剂盒可以检测 NK 细胞亚群中胞内 IFN-γ。实时 RT-PCR 可以通过双标记荧光探针精确地量化细胞因子转录子的拷贝数。少量细胞（$\geqslant1\times10^5$）就可以提取 RNA，并且一个样品可以检测多个细胞因子，但需要特殊的仪器设备和荧光标记的探针（Perkin Elmer，Applied Biosystems）。

人 NK 细胞亚群的细胞毒性分析

NK 细胞具有三个方面的细胞毒性：天然毒性、淋巴因子活化的杀伤作用（LAK）

及抗体依赖细胞介导的杀伤作用（ADCC）。人 NK 细胞对有些细胞株具有天然的毒性，最显著的是 K562 细胞株。用 IL-2 等细胞因子预处理 NK 细胞可诱导 LAK 活性，该活性可以用 NK 细胞裂解 Daudi（单元 8.14）或 Colo205（ATCC＃CCL-222）等 NK 细胞抵抗的细胞株进行检测。

参考文献：Cooper *et al.*，2001a，b

撰 稿 人：Megan A. Cooper and Michael A. Caligirui

［刘书逊（单元 8.1～8.7，单元 8.17～8.19）　徐红梅（单元 8.8～8.16）］

第九章　HIV 的检测与分析

目前关于研究 HIV 感染免疫特性是免疫学研究中最重要的领域之一。人们在研究 HIV 感染的免疫应答时，获得了很多关于所有免疫应答的基本机制方面的新信息。

HIV 免疫学研究至少在两个方面有别于其他的免疫学研究。其一，研究人员在进行研究时应该严格执行生物安全程序以便将接触病毒的风险降至最低。如果皮肤或黏膜接触了病毒，用抗反转录病毒药物进行接触后预防可以减少感染的风险。在美国，职业与健康司（OSHA）颁布的血液病原体操作标准要求建立一套适当的职业健康程序，以便于在发生病毒接触事故后，为研究人员提供咨询、抗反转录病毒药物预防及进行血清学监测。其二，HIV 研究人员必须掌握更多与病毒学相关的知识和技术。本章的操作方案中，详细列出了进行 HIV 研究应遵循的一些条件，其他信息也可以在前言中找到。

单元 9.1 描述 HIV 培养和定量方法及 HIV 感染物引起细胞病变能力的评估方法。研究人员通过这些方法可以获知所研究病毒的活性及病毒颗粒的确切数量。此处所描述的 HIV 滴定方法远比以前的方法要精确，通过这些测定方法检测到的 AIDS 患者感染细胞数及其体内的病毒滴度比以前认为的高得多。

单元 9.2 描述了用 HIV 感染新鲜 $CD4^+$ T 细胞和细胞系的方法，以及用对病毒有抗性的细胞来产生慢性感染细胞系的方法。这些细胞系对 HIV 研究很重要，因为它们可以用于产生大量病毒蛋白，并可作为研究病毒感染的细胞模型。

HIV 感染的单核细胞和巨噬细胞是机体中重要的 HIV 储存库，造成 HIV 的全身播散。HIV 感染并摧毁这类细胞，可能是其破坏宿主免疫功能的最终基础。

单元 9.3 介绍有关 HIV 感染单核/巨噬细胞，包括在这些细胞中培养和定量检测 HIV，以及重新感染新鲜培养的单核细胞和巨噬细胞的方法。还提供了一个扩增 HIV 嗜巨噬细胞株的辅助方法。总之，由于细胞种类和 HIV 株的不同生物学特性，HIV 感染单核/巨噬细胞和其感染 T 细胞的特点是很不一样的。因此，为了评价药物和其他治疗试剂对病毒生长的效应或者获取 HIV 感染及其治疗的完整方案，同时使用这两种细胞来研究 HIV 免疫学是至关重要的。

HIV 可以作为一个完整的病毒来进行检测和定量测定（单元 9.1），也可以检测 HIV 蛋白（单元 9.4）或 DNA/RNA（单元 9.5）。

单元 9.4 描述了检测蛋白质提取物中的 HIV 病毒蛋白（免疫印迹检测）和细胞中 HIV 病毒蛋白的检测（免疫荧光检测）。此外，还描述了一种检测病毒相关的反转录酶的功能性检测方法。总之，这些方法提供的关于细胞培养物中病毒数量的信息是相互补充和重叠的。例如，用 ELISA 法检测 p24 抗原（有商业化的试剂盒可用）时即使病毒不处于复制期也可被检测出，从而可以弥补反转录酶检测法的不足；而反转录酶检测法是一种检测复制期病毒存在与否的敏感方法。另一方面，免疫印迹法不仅能定性和定量地检出 HIV 产物是否存在，还能显示这些产物存在的范围。免疫荧光检测法可以检出

培养物或组织中感染 HIV 的细胞数量。

单元 9.5 介绍了基于 PCR 技术来检测 HIV DNA 和 RNA 的方法。在 HIV 研究中这些方法有两个方面重要价值。其一，可以超敏感地检测出整合的病毒 DNA 及这些 DNA 转录的 RNA；其二，对 HIV 进行分子生物学研究时，这些方法是必不可少的，因为这些方法可以对多种情况下产生的 HIV RNA 进行单独的检测和定量。

单元 9.6 叙述了多种抗病毒制剂抗 HIV 效果的研究方法，这对研发治疗 HIV 感染药物尤其重要。

单元 9.7 介绍了一种定量检测方法，由 HIV 的 Env 蛋白与 CD4 及其他辅受体相互作用而介导细胞-细胞融合。该方法使用牛痘病毒表达系统与报道基因活性检测法（标准融合检测法）。还有一种备选检测法是利用融合时作用的先后顺序而建立的，因为 Env 被活化是在与 CD4 和辅受体结合并相互作用后。此外，该单元还着重指出了这两种方法各自的优点所在。

撰 稿 人：Warren Strober

单元 9.1　外周血中 HIV 的分离和定量检测

用单元 9.4 的方法检测外周血样品中的 HIV 时不需要进行病毒滴定，检测 HIV 时不考虑病毒的复制能力，单元 9.3 以非定量的方式检测具有复制能力的病毒。

注意：当使用人的血液、细胞或感染物时，必须严格遵循生物安全操作规程（见前言）。

基本方案 1　外周血中 HIV 的培养以及通过 TCID 定量来测定其滴度

注：所有的培养都在 37℃，含 5%CO_2的加湿培养箱中进行。

材料（带√项目见附录 1）

来自正常个体（HIV-血清反应阴性）及感染个体（HIV-血清反应阳性）的全血

√无菌 PBS，pH7.2，或 HBSS

√Ficoll-Hypaque 溶液

√含 2 μg/μl 植物血凝素（PHA）或 5%（*V/V*）人 IL-2 的 RPMI-10 完全培养基（表 5.0.1）

肝素钠真空试管（附录 3G）

Sorvall RT-6000 离心机及 H-1000B 转子（或与其相当的离心机和转子），并配备可以离心培养板的托架

50ml 聚丙烯离心管，无菌

24 孔微量滴定板，无菌（Falcon）

1. 将 HIV-血清反应阴性供者的全血收集到含有肝素钠（浓度≤20U/ml）的无菌真空试管中。血样在室温保存并且在 4h 内进行处理。

   每毫升全血的 PBMC 预期得率为 $1\times10^6\sim2\times10^6$ 个细胞。

2. 用无菌的 PBS（pH 7.2）或 HBSS 将血样 1∶1 稀释。在无菌的 50ml 离心管中，将 4 体积的稀释血样铺于 1 体积的 Ficoll-Hypaque 溶液上面，使分层。
3. 室温，400*g* 离心 20min。收集血浆/Ficoll-Hypaque 交界面的 PBMC（图 8.1.1）。用 3～4 体积的 PBS 或 HBSS 稀释。
4. 室温或 4℃，200*g* 离心 5min。弃上清，用 PBS 或 HBSS 装满试管并将细胞重悬。温和地涡旋混匀，重复 2 次，总共洗涤 3 次。
5. 用含 2μg/ml PHA 的 RPMI-10 完全培养基重悬细胞，并调整 PBMC 的浓度为 1×10^6～2×10^6 个细胞/ml（附录 3A）。培养 48～72h，在步骤 10 前，将细胞重悬于含有 IL-2 的培养基中，浓度为 4×10^6 个细胞/ml。
6. 按步骤 1，将 HIV-血清反应阳性供者的全血≥5ml 收集到含肝素钠的无菌真空试管中。
7. 将血样以 400*g* 离心 5min，温和地吸取血浆，注意不要扰动细胞沉块。将血浆保存在冰上以用于步骤 11b 的分析（4h 内使用）。
8. 用相当于原始血样 2 倍体积的无菌 PBS 或 HBSS 重悬细胞。在 50ml 的无菌离心管中，将细胞悬液仔细地铺在 15ml Ficoll-Hypaque 溶液上面（室温），不要扰动界面。
9. 按步骤 3 和 4，收集 PBMC 并重悬于 3ml 含 5%人 IL-2 的 RPMI-10 完全培养基中。用血细胞计数器计数细胞。
10. 将步骤 5 中经 PHA 刺激的供者 T 淋巴母细胞铺于 24 孔微量滴定板中的 12 个孔，每孔的细胞量为 2×10^6 个。

11a. PBMC 中 HIV 滴度的测定：将步骤 9 的 HIV-血清反应阳性的 PBMC 按如下浓度加入 5 个孔中：2×10^6、2×10^5、2×10^4、2×10^3 和 2×10^2 个细胞/孔。在第 6 孔中不加入 PBMC（0 个细胞）作为阴性对照。

11b. 血浆中 HIV 滴度的测定：将步骤 7 的血浆按如下的量加入剩余的孔中：1000、200、40、10 和 2μl/孔。在最后一孔中不加血浆（0μl）作为阴性对照。

未使用的血浆可储存于－70℃（用于培养）或者 4℃（用于抗体检测）。

12. 向每孔中加入含 5%人 IL-2 的 RPMI-10 完全培养基，终体积为 1.5ml，孵育 24h。
13. 将组织培养板放入培养板托架中，室温，200*g* 离心 5min。将每孔的培养上清弃掉 1ml，补加 1ml 新鲜的含 5%人 IL-2 的 RPMI-10 完全培养基，再次离心。重复 2 次，总共洗涤 3 次。
14. 维持培养≤14d，每周更换 2 次培养基，更换培养基时将组织培养板在 200*g* 离心 5min。将每孔的培养上清取出 1ml 并保存于－70℃，加入 1ml 新鲜的含 5%人 IL-2 的 RPMI-10 完全培养基继续孵育。
15. 检测上清中 p24 抗原的含量（单元 9.4）。如果上清中 HIV p24 抗原的浓度在 2 次连续测定中均超过 200pg/ml，或单次测定时超过 1000pg/ml，则认为该培养物是 HIV 阳性的，并终止培养。将 p24 阳性上清分装成小份储存于－70℃。
16. 对 HIV p24 阳性孔进行分析，找出其中 PBMC 含量最少或血浆体积最小的那一孔，其 PBMC 或血浆的量即为终点值。将病毒滴度结果表示为每 10^6 PBMC 或每毫升血浆的组织培养感染剂量（tissue culture infectious dose，TCID）。

例如，如果终点孔含有2×10^6个细胞，则病毒滴度为$1\times10^6/2\times10^6$=每10^6个细胞0.5 TCID。对血浆而言，如果终点孔含有1000μl血浆，则病毒滴度为1000μl/ml=每毫升血浆1 TCID。

基本方案2 感染同种异型T淋巴母细胞：原代分离PBMC中的HIV

材料（带√项目见附录1）

T淋巴母细胞，来源于HIV-血清反应阴性血样（见基本方案1）
PBMC，来自HIV-血清反应阳性的血样（见基本方案1）
√RPMI-10完全培养基含或不含5%～10% IL-2（用量取决于其纯度；表5.0.1）
冷冻台式离心机

1. 按基本方案1中的步骤1～5，从HIV-血清反应阴性的血样中制备T淋巴母细胞。
2. 将所得的T淋巴母细胞用RPMI-10完全培养基洗涤2次并以0.1×10^6～1×10^6个细胞/ml的浓度重悬于含5%～10% IL-2的RPMI-10完全培养基中。
3. 按基本方案1中的步骤6～10，从HIV-血清反应阳性的血样中制备PBMC。以1×10^6 PBMC/ml的浓度重悬于含IL-2的RPMI-10完全培养基中。
4. 将来自HIV-血清反应阳性血样的1×10^6 PBMC加入5×10^6（10ml）同种异型T淋巴母细胞中（常用比例为1∶5～1∶10）。
5. 将PBMC / T淋巴母细胞在含5%～10% IL-2的RPMI-10完全培养基中进行共培养，并用倒置显微镜监测合胞体的出现（对于某些供者的PBMC培养物，即使病毒能进行有效的复制，也可能不出现明显的合胞体）。
6. 从第3天开始，每2～3天收集50%的培养上清，并补充新鲜的含5%～10% IL-2的RPMI-10完全培养基，直到感染后第15天。将上清储存于−70℃直至所有样品收集完毕。
7. 从共培养开始算起，2～4周内检测上清中病毒的产量，即测定p24抗原的产量（ELISA）或反转录酶活性（单元9.4）。
8. 选择病毒产量最高的上清作为HIV的供源。如果2或3个时间点的上清有相同的最大病毒产量，则将其合并同时测定其病毒滴度（图9.2.1）。

培养2～3周后添加新的T淋巴母细胞引起HIV的新一轮播散，可以增加培养上清的病毒滴度。

辅助方案 评估HIV对$CD4^+$靶细胞的致细胞病变效应：HIV介导的细胞死亡

HIV体外感染$CD4^+$靶细胞会导致细胞死亡。测定该效应的最常用的方法包括台盼蓝拒染法（附录3C）、^{3}H TdR法（附录3E）、免疫荧光定量检测死亡的$CD4^+$细胞数量（流式细胞分析；第四章）、用微量滴定板读板仪比色分析（单元1.1）、用DNA杂交技术检测是否有典型的“阶梯”型DNA片段从而检测凋亡的发生（单元2.14）。

直接测定细胞死亡百分率的方法，比如台盼蓝拒染法或流式细胞分析死亡的 $CD4^+$ 细胞，必须考虑到这些方法是选择性地测定一个特定的 HIV 样品杀伤靶细胞的能力。^3H TdR 水平通常只反映 HIV 对细胞的杀伤活性，但不能区分细胞生长停滞（发生在细胞死亡之前，但并不一定意味要发生细胞死亡）和细胞死亡。如果使用的细胞混合物中包含对 HIV 感染敏感和不敏感的细胞时，如 T 淋巴母细胞中的 $CD8^+$ 细胞通常不被 HIV 感染或杀伤，^3H TdR 法可能无法真实地反映出培养中发生的 $CD4^+$ 细胞死亡的水平。

当使用这些方法时，必须遵循下列安全指南。

台盼蓝拒染法：细胞计数完毕，将污染的细胞计数板和盖玻片（在弃置及下次使用前）用漂白剂消毒≥5min。

^3H TdR 法：使用细胞收集器收集 HIV 感染细胞的前后，用 200～300ml 甲醇充分洗涤抽吸器。

流式细胞仪分析：强烈推荐使用经过固定的细胞以消除或极大地减少仪器污染或使用者感染的风险。使用后，用适当的去垢剂（按厂商推荐）清洗流式细胞仪。

比色法：使用前后，用甲醇清洁微量滴定板读板仪的探头。

凋亡分析：向细胞加入含 SDS 的裂解液灭活 HIV 病毒。

参考文献：Ho *et al.*，1989，1991

撰 稿 人：Richard A. Koup，David D. Ho，Guido Poli，and Anthony S. Fauci

单元 9.2　感染 $CD4^+$ 原代细胞系及 HIV 的诱导

注意：当使用 HIV 感染者的血液、体液和细胞时，必须遵循 BL-3 生物安全操作规程（见前言）。

注：所有的孵育都是在含 37℃，5%CO_2 的加湿培养箱中进行。所有与细胞接触的溶液和器材必须是无菌的，整个过程都要无菌操作。

基本方案 1　用 HIV 体外急性感染 $CD4^+$ 原代细胞及细胞系

表 9.2.1 列出了一些最常用于体外 HIV 感染的 $CD4^+$ 靶细胞。用其他不同谱系的 $CD4^+$ 细胞系也可获得相应的结果，还有一些 $CD4^-$ 细胞在一定的实验条件下也可被感染。

材料

$CD4^+$ 细胞系（表 9.2.1）

与细胞系相适应的完全培养基（如 RPMI-10 完全培养基；附录 1）

表 9.2.1　用于 HIV 体外感染的 $CD4^+$ 靶细胞

细胞	感染效率	相关特性
原代细胞		
T 淋巴母细胞	高	不同来源供者的细胞有差异
纯化的 $CD4^+$ T 细胞	非常高	去除 $CD8^+$ 细胞可能导致更高的病毒复制效率
单核细胞	可变	某些细胞因子及体外成熟可增加感染性；不同供者细胞有差异
T 细胞系		
Jurkat	高	存在表面信号传递分子
CEM	高	有几种变异体
Sup-T1	高	共表达 CD4 和 CD8；高融合性
MOLT-4	高	高细胞致病变性和融合性
HUT-78/H-9	高	高融合性
MT-4	非常高	HTLV-1 转化；高细胞致病变性
髓系-单核细胞系		
HL-60	低	对细胞-细胞介导的感染敏感
U937	高	中度细胞致病变性
THP-1	中	明显的细胞致病变性
其他细胞系		
EBV-转化的 B 细胞	可变	可以用自体细胞进行实验
SW480（结肠癌）	高	贴壁生长
HeLa-CD4（卵巢癌）	高	贴壁生长；将人 CD4 稳定转染 HeLa 而得

1. 感染前将靶细胞系维持培养在对数生长期（$1\times10^6\sim5\times10^6$个细胞/ml）2～3d。
2. 用台盼蓝拒染法估计靶细胞的总数及活力（附录 3C）。要有效感染细胞，须保证活力>95%。
3. 用完全培养基重悬细胞，在室温下，300g 离心 10min。用完全培养基重悬细胞使其浓度为 10^5 个细胞/ml。

4a. 如果病毒样品的感染滴度已知：计算感染复数（multiplicity of infection，MOI），即感染单位数（infectious unit，IU）与靶细胞数的比值。用选定实验条件所需的 MOI（常为 0.01～0.0001）计算感染靶细胞所需的病毒量。

4b. 如果 MOI 未知且使用的是上清原液：将上清原液按 1∶10、1∶100、1∶1000 稀释后分别感染靶细胞。

5. 培养细胞。如果用较高的 MOI（≥0.01）进行感染，培养 2～4h 后将细胞在室温下，300g 离心 10min 以除去过量的病毒（否则这些过量的病毒会使病毒产量的初次测量值偏高）。洗涤细胞 1 次，重悬于完全培养基中继续培养。

   为了便于病毒的初始播散，一开始可以将较步骤 3 中浓度更高的细胞重悬于小体积培养基中。比如浓度为 10^5 个细胞/ml 而终体积为 10ml 的细胞量，可以先将细胞重悬于 1ml 完全培养基中，加入相应量的病毒，温和地混匀，培养 2～4h 后加入 9ml 培养基使得细胞终浓度为 10^5 个细胞/ml。

6. 观测感染培养物中合胞体及细胞死亡的情况（通常在 24～72h 观测）。
7. 维持培养 7～14d（在此期间体外感染的大多数细胞系可表现出病毒复制高峰，见图 9.2.1），按照单元 9.1 所述，收集特定时间点的上清。如果细胞浓度太高（培养基的颜色变得很黄），弃掉 3/4 的细胞悬液并将剩余的 1/4 重悬于新鲜培养基中。将上清储存于－70℃直到所有样品收集完毕，然后测定反转录酶活性或 p24 抗原的含量（单元 9.4）。

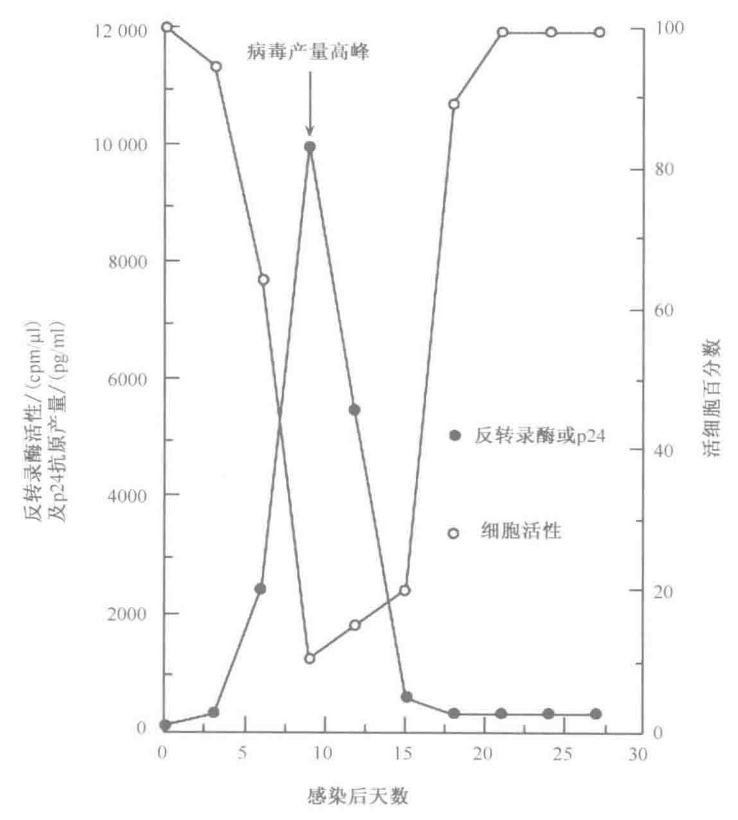


图 9.2.1　HIV 体外急性感染的典型图示。CD4⁺ 细胞或细胞系与 HIV 孵育后，先出现一个长短不等的滞后期，随后病毒复制逐渐达到高峰（此处用反转录酶活性或 p24 抗原产量来表示）同时细胞死亡也达到最大程度。随着所用的靶细胞和病毒的不同，这些参数可能发生很大的改变。

基本方案 2　建立 HIV 慢性感染细胞系

材料

CD4$^+$ 细胞系（表 9.2.1）

与细胞系相适应的完全培养基（如 RPMI-10 完全培养基；见附录 1）

96 孔、48 孔或 24 孔圆底微量滴定板（Costar）

1. 按照基本方案 1，步骤 1～5，用 HIV 感染 CD4$^+$ 细胞系。

2. 按照基本方案1，步骤7，培养感染的细胞并观察合胞体及细胞死亡的出现。感染后每两天检测反转录酶活性以找出病毒产生的高峰时刻（见基本方案，步骤8）。
3. 当病毒产量达到高峰时，将细胞重悬于完全培养基中。以每份0.2个细胞/200μl铺于96孔圆底的微量滴定板孔中。不用饲养细胞，进行有限稀释细胞克隆形成实验（如单元1.3）。

   由于HIV感染，存活的细胞常丢失了其CD4表面标记。病毒慢性感染并不引起显著的细胞病变。
4. 培养细胞，7～14d后用倒置显微镜观察是否有克隆形成。
5. 用48孔或24孔圆底微量滴定板扩增一组克隆，通过测定上清中反转录酶活性或p24抗原含量来首次筛选HIV的组成性表达。
6. 选择、扩增并冻存高表达HIV的细胞克隆。
7. 用细胞系来研究HIV表达的诱导（见基本方案3）。

基本方案3　慢性感染细胞系中HIV的诱导

本方案简述了对持续感染细胞系U1（从U937细胞系产生；表9.2.1）通过刺激剂进行HIV诱导以检测这些刺激剂对病毒表达的诱导效应。

材料

慢性感染细胞系（见基本方案2）
刺激剂（如细胞因子、抗病毒药物和微生物制剂）
96孔平底微量滴定板或组织培养瓶

1. 将细胞系在对数生长期维持培养2～3d。不要让细胞浓度超过5×10^5个细胞/ml。
2. 用台盼蓝拒染法估计细胞浓度及活力（附录3C）。如果细胞活力高（>95%），在室温下，300*g*离心10min，将细胞按所需的终浓度（如1×10^5～2×10^5个细胞/ml）重悬于完全培养基中。
3. 将细胞铺于无菌的96孔平底微量滴定板或组织培养瓶中。
4. 加入适当浓度的刺激剂（如对96孔板加入180μl细胞悬液及20μl 10倍浓度的刺激剂）。
5. 培养细胞，每24～48h收集培养上清（至少20～30μl），时间≥7d，依细胞系而定。上清储存于－70℃，收集完毕后按步骤6检测。

   大多数慢性感染细胞系在刺激后48～120h期间被诱导释放的病毒水平达到最高。
6. 一次性测定上清中p24抗原的含量或反转录酶的活性（单元9.4）。图9.2.2显示的是U1细胞病毒表达的典型诱导曲线。

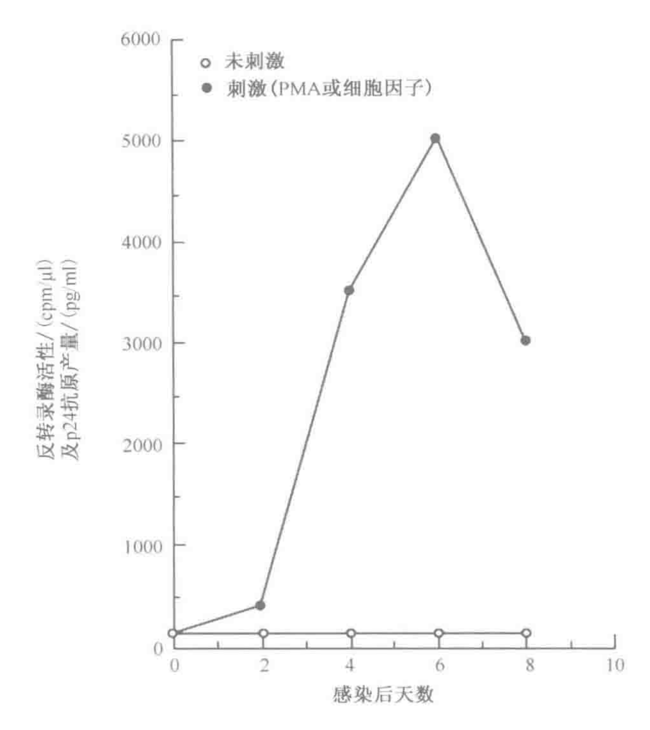


图 9.2.2 持续感染细胞经刺激后 HIV 表达的典型图示。尽管佛波酯、细胞因子和其他一些刺激剂容易诱导病毒的产生，但是有几种慢性感染细胞仍然不能组成性产生足量的 HIV。病毒产量可以通过检测培养上清中反转录酶的活性或 p24 抗原的产量进行测定，刺激后病毒的产量会持续升高数天。

参考文献：Poli and Fauci，1992；Walker *et al*.，1986

撰 稿 人：Guido Poli and Anthony S. Fauci

单元 9.3 在单核细胞和巨噬细胞中培养 HIV

注意：本单元介绍的操作包含使用人血及来自 HIV-血清反应阳性个体的细胞和 HIV 病毒储存液。使用人血时必须遵循相应的生物安全操作，处理病毒储存液及 HIV 感染的细胞时，必须遵循 BL-3 生物安全操作规程（见前言）。保存病毒的冻存瓶在开瓶之前应解冻，因为冻存瓶中内容物可能处于一定压力之下。真空抽吸系统应该放置于层流柜里面，并带一个含 10%漂白剂的瓶子，再连接第二个瓶子及 0.45μm 的滤膜以截获任何液体从而防止液体进入真空抽吸系统。

注：除非另外说明，所有的培养都是在含 37℃，5% CO_2 的加湿培养箱中进行。除非指明，培养基应该预热到 37℃。所有溶液必须是无菌的，并无菌操作。培养上清、试剂及培养基都应当无内毒素。

基本方案 单核细胞来源的巨噬细胞培养和 HIV 感染

药物或生长因子的加入时间依试剂及实验方案而定，单核细胞通常在分离的当天加

入，成熟的单核细胞来源的巨噬细胞（monocyte-derived macrophages，MDM）则在HIV感染前、感染时或感染后加入。

材料（带√项目见附录1）

亲巨噬细胞的HIV-1病毒株（亲M株，实验室保存品，见辅助方案1，或原代分离，见辅助方案2）

MDM，分离后5～7d，经贴壁或淘选纯化（单元8.5），培养在24孔板或$25cm^2$或$80cm^2$的培养瓶内

PBS（如Life Technologies公司生产的）含1%FBS

√含添加物的Iscove's/RPMI-1640培养基

连接到真空抽吸系统的吸头

1.8ml螺口冻存瓶（如Nunc）

1. 感染前，将所需量的HIV-1冻存品在层流柜内室温下解冻。
2. 对于培养在24孔板或$25cm^2$或$80cm^2$培养瓶内的浓度为0.5×10^6～1×10^6个细胞/ml的MDM，加入HIV-1使$TCID_{50}$为每毫升10^5～10^6感染单位（IU）并孵育2～4h。每次实验设置一个不加HIV-1的MDM对照。

   对于浓度为1×10^6个细胞/ml的MDM，相当于感染复数（MOI）为每个细胞0.1～1.0感染单位。HIV-1的滴度可以按照辅助方案2测定。为了达到MDM的最佳感染，建议MOI为0.1～1.0。然而，根据实验性质，也可以使用更高或更低MOI的HIV-1。

   另外，可以用热灭活的HIV-1（60℃，30～60min）感染MDM作为对照。灭活的病毒储存品应该检验病毒是否真正被灭活，常用DNA酶处理（10U/ml）热灭活的HIV-1后，再感染MDM并培养48h后用PCR检测裂解液以确认HIV-1在MDM中没有复制。
3. 从贴壁的MDM细胞培养体系中移除病毒，温和地吸走所有培养基，不要扰动细胞，用连接真空抽吸系统的吸头吸取。要洗去残留的病毒，需仔细加入预温的PBS/FBS（24孔板每孔加1ml，或者每瓶加10ml），再温和地吸去。重复洗1次。
4. 用预温的含添加物的Iscove's/RPMI-1640培养基洗1次以去除PBS/FBS。加入培养基保持细胞浓度在0.5×10^6～1×10^6个细胞/ml并补足所用的生长因子和药物。
5. 培养MDM，每5～7d更换培养基，换液时先吸出一半的培养基，再补加新鲜的培养基和所用的生长因子及药物。收集吸出的培养上清并储存于－70℃直至检测p24抗原或反转录酶活性以测定病毒产量（单元9.4）。

   通常，当MOI为0.1～1.0时，在感染后1～6d可以在MDM上清中检测到少量的病毒产生。HIV-1抗原或反转录酶活性逐渐增加并在第10～21d达到高峰。在某些培养物中，感染后3个月还能检测到病毒产生。
6. 终止MDM培养后，用适当的缓冲液裂解细胞并进行进一步的分子生物学或生物化学分析（单元9.5）。

备选方案 用 HIV 悬液感染单核细胞来源的巨噬细胞

附加材料（其他材料见基本方案）

经贴壁或淘选纯化（单元 8.5）的 MDM，并培养 5～7d，培养在 15ml、30ml、60ml 的 Teflon 罐子内（如 Savillex）

15ml 和 50ml 聚丙烯锥形管

Beckman 离心机及 GH-3.8 转子，或与其相当者

1. 用移液器的枪头温和地搅动细胞。将 MDM 和培养基从 Teflon 罐子转移到 15ml 或 50ml 聚丙烯锥形管，室温下，500*g* 离心 7min。计数细胞（附录 3A）并以 0.5×10^6～1×10^6 个细胞/ml 的浓度重悬于含添加物的 Iscove's 或 RPMI-1640 培养基中。
2. 将 MDM 培养物平均分配到两个 Teflon 罐子中，因此罐子是半满（不要超过 2/3)。为了检测各种制剂（如抗病毒药物、细胞因子）的效应，可将培养物分装到适当数量的罐子中。将盖子松松地盖上。

   处置 Teflon 罐子时必须特别小心以避免塑料移液器或枪头将其刮伤，而且必须用温和的洗涤剂（如用于组织培养的 7X 无毒洗涤剂；ICN）仔细地清洗并充分地冲洗以防止洗涤剂滞留在表面或刮痕处。Teflon 罐子必须进行常规性的基础硅烷化处理，并且每次使用前要在烤箱中处理（180℃、4h）以去除内毒素。
3. 当解冻 HIV-1 储存品时，将 MDM 及培养基转移到 15ml 或 50ml 聚丙烯锥形管中，室温下，500*g* 离心 7min。
4. 吸去上清，按照 MOI 为 0.1～1.0 IU/细胞，将亲巨噬细胞 HIV-1 病毒株加入 MDM 沉淀（未感染 MDM 作为对照）。温和且充分混匀后将培养物转移到适当大小的 Teflon 罐子中。
5. 2～4h 后，将 HIV 感染和未感染的 MDM 转移到 15ml 或 50ml 聚丙烯锥形管中，室温下，500*g* 离心 7min，以去除残留的病毒。吸去上清，加入 PBS/FBS，重复 2 次洗涤细胞。用含添加物的 Iscove's/RPMI-1640 培养基再洗一次，并将 MDM 以 0.5×10^6～1×10^6 个细胞/ml 的浓度重悬于新鲜培养基中。
6. 培养 HIV 感染和未感染的 MDM 直到进行所需要的检测为止。每 5～7d 更换培养基，换液时，先离心，吸出一半的培养基，再用预温的新鲜培养基补充。将吸出的上清用 1ml 冻存管储存于－70℃用于测定其 p24 抗原的含量或反转录酶活性（单元 9.4）。

辅助方案 1 扩增实验室保存的亲巨噬细胞的 HIV-1 病毒株

亲巨噬细胞的 HIV 株也可以在 PBMC 中进行大量扩增并大致保持其感染巨噬细胞的能力（见单元 9.1）。

材料（带√项目见附录 1）

通过贴壁法从 PBMC 分离而得的单核细胞

亲巨噬细胞 HIV-1 株实验室保存品，如 HIV-$1_{Ba\text{-}L}$、HIV-$1_{JR\text{-}FL}$（AIDS 研究与参照试剂方案；http://www.aidsreagent.org）
√含添加物的 Iscove's/RPMI-1640 培养基
80cm^2 培养瓶
Beckman 离心机及 GH-3.8 转头，或与其相当者
0.22μm 滤膜
1.8ml 和 5ml 冻存管（如 Nunc）
50ml 锥形管

1. 新鲜分离的 4×10^7 单核细胞在 40ml 的含添加物的 Iscove's/RPMI-1640 培养基中于 80cm^2 培养瓶内进行贴壁，HIV-1 感染前孵育 5～7d。
2. 温和地吸去上清，按照 MOI 为 0.1～1.0IU/细胞的 10ml HIV-1 储存品，感染 4～8h。
3. 加入 30ml 含添加物的 Iscove's/RPMI-1640 培养基继续培养细胞。
4. 在 HIV-1 感染后第 7、14 和 21 天，收集 20ml 含有 HIV-1 的上清。向贴壁的 MDM 加入 20ml 新鲜培养基继续培养。在 4℃，750g 离心 10min。取上清液用 0.22μm 滤膜过滤，将适当体积（如 1ml 和 4ml 分装）的上清滤液装入冻存管中储存于－70℃。
5. 用 p24 抗原检测试剂盒或反转录酶活性检测法测试 HIV-1 储存品，并用 $TCID_{50}$ 法测定 MOI。

辅助方案 2 扩增原代分离的亲巨噬细胞的 HIV-1 病毒株

本方案对很难增殖的原代分离病毒的扩增尤其有用，如从慢性非进行性患者或高活性抗反转录病毒治疗（high active antiretroviral therapy，HAART）伴低病毒负荷的患者中分离原代病毒。

材料（带√项目见附录 1）

PBMC，用密度梯度离心法从 2 个 HIV-血清反应阳性供者分别分离而得（单元 8.1）
亲巨噬细胞 HIV-1 株原代分离储存品（按照单元 9.1，从 HIV-血清反应阳性个体 PBMC 扩增而来）
√RPMI-10 完全培养基
植物血凝素（PHA；如 Murex Diagnostics）
巨噬细胞集落刺激因子（M-CSF；如 Genzyme）
白细胞介素-2（IL-2；如 Boehringer Mannheim）
25cm^2 培养瓶
14ml 聚丙烯圆底管（如 Nunc）
15ml 锥形管
抗 CD8 磁珠（如 Dynal）
磁珠分离器（如 Dynal）
样品混合器（如 Dynal）
1.8ml 冻存管（如 Nunc）

1. 将来自两个 HIV-血清反应阳性供者的新鲜分离的 PBMC 按 2×10^6 个细胞/ml 的浓度分别重悬于 RPMI-10 完全培养基。在 $25cm^2$ 培养瓶中，用最适浓度的 PHA 分别刺激（按照单元 9.1 所述）来自不同供者的 $\geq2\times10^7$ 的 PBMC，并加入 M-CSF 使终浓度为 750U/ml，培养 3d。
2. 用血细胞计数板计数（附录 3A）来自不同供者的 PBMC 并将其按 1∶1 的比例混合。将细胞在 4℃，500*g* 离心 7min，重悬于 5ml RPMI-10 完全培养基。
3. 用抗 CD8 磁珠剔除 CD8 阳性细胞毒 T 细胞（通常为总 PBMC 的 10%），按照厂商的说明及下列通用指导原则进行：
   a. 剔除前洗涤磁珠，将所需量的 CD8 磁珠（每 1×10^7 PBMC 需 100μl 磁珠）转移到一个 14ml 圆底的聚丙烯管中，用 1ml RPMI-10 完全培养基将其重悬。
   b. 将试管置于磁珠分离器上 3min，然后用移液器温和地移去培养基。加入 1ml RPMI-1640 培养基重复洗涤 2 次。
   c. 将磁珠与 PBMC 悬液混合于一个 14ml 圆底试管中，置于样品混合器上在 4℃孵育 30min。
   d. 将试管置于磁珠分离器上 3min，收集 CD8 细胞剔除的 PBMC 到一个新的试管中。
4. 进行第二轮的 CD8 细胞剔除，但每 1×10^7 PBMC 仅用 10μl 磁珠与其孵育。
5. 将 2×10^7 CD8 细胞剔除的 PBMC 转移到一个 15ml 锥形试管，4℃，500*g* 离心 7min，吸去培养基。将细胞沉淀重悬于 2ml 亲 Mϕ 株原代分离病毒液（MOI 0.1～1.0）转移到一个 $25cm^2$ 培养瓶内，感染 4h。
6. 加入 8ml 含有 10U/ml IL-2 及 750U/ml M-CSF 的 RPMI-10 完全培养基。培养 3d。
7. 感染后第 3、10 和 17 天，半量更换培养基：将 5ml 培养上清（及其中所含的细胞）转移到一个 15ml 锥形试管中，4℃，700*g* 离心 10min（以澄清病毒上清），将细胞沉淀重悬于 5ml 含有 10U/ml IL-2 的新鲜 RPMI-10 完全培养基中，加入原培养瓶中继续培养。收集含有 HIV-1 的上清，用 0.22μm 滤膜过滤，分装为 1ml 的量用 1.8ml 冻存管储存于－70℃。
8. 感染后第 7 和 14 天，用 1×10^7 CD8 细胞剔除的且经 M-CSF 及 PHA 刺激过的 PBMC 饲养 HIV-1 感染的培养细胞。同第 3 天，将 5ml 培养上清在 4℃，700*g* 离心 10min，收集含病毒上清并储存于－70℃。但此时弃掉细胞沉淀，加入 5ml 含有 10U/ml IL-2 及 750U/ml M-CSF 的 RPMI-1640 的新鲜刺激过的 PBMC，加入原培养瓶中继续培养。
9. 感染后第 21 天，终止培养，收集剩余的 10ml 上清，并弃掉 PBMC。
10. 检测 p24 抗原（单元 9.4）以测试 HIV-1 储存品，并用 $TCID_{50}$ 法测定每毫升感染单位数（IU/ml）。

参考文献：Kedzierska *et al*.，2000；Sonza *et al*.，1996

撰 稿 人：Suzanne Crowe，Clare Mashlin，Philip Ellery，and Katherine Kedzierska

单元 9.4　HIV 蛋白的检测

除这里所介绍的方法外，培养上清中病毒抗原还可以用双抗体夹心法 ELISA 或动

力学 ELISA 进行定量测定，两种检测方法都有多种试剂盒可用（如 Coulter 和 DuPont）。由于不同的检测方法会提供互补的信息，因此两种或多种检测方法的组合可增加检测结果的可信度。

注意： 本单元描述的操作必须在生物安全 2 级（biosafety level 2，BL-2）或更高级的设施中进行直至病毒被灭活。当使用 HIV 感染者的血液、体液和细胞时，必须遵循 BL-3 生物安全操作规程。关于生物安全级别的论述，见前言。

注： 所有的培养都是在 37℃，含 5%CO_2 的加湿培养箱中进行。

基本方案 1　免疫印迹法检测 HIV 蛋白

本方案用蛋白质提取法定量测定细胞样品中病毒蛋白的含量。用抗 HIV-血清及 ^{125}I 标记的葡萄球菌蛋白 A 来进行检测。也可以用酶联二抗（生物素化的抗人 IgG 抗体）和适当的颜色指示剂（亲和素-过氧化物酶耦合物及化学发光底物）进行检测以避免使用同位素。任何细胞（包括培养的细胞系、培养的原代细胞及新鲜分离的外周血淋巴细胞）都可以用本方法进行检测。

材料（带√项目见附录 1）

待检测的细胞
√PBS，无菌
√TENC 裂解缓冲液，含或不含 2%脱氧胆酸钠
√转膜缓冲液
√1×TN 缓冲液，pH7.4
用 1×TN 缓冲液配制的 5%脱脂奶粉溶液，pH7.4
√TN-TN 缓冲液，pH7.4
抗 HIV 多克隆抗血清
√TN-T 缓冲液，pH7.4
用 TN-T 缓冲液配制的 3% 牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）溶液，pH7.4
0.1mCi/ml [^{125}I] 蛋白 A（低比活性；NEN)，用 3% BSA/TN-T 溶液配制，pH7.4
10mmol/L EDTA，用 TN-TN 缓冲液配制，pH7.4
台式离心机及适当管子
玻璃器皿或可密封的袋子
平板摇床

1. 计数细胞（附录 3A），将 5×10^6～1×10^8 个细胞放入离心管中。室温，400g 离心 8～10min，移去上清。将细胞重悬于 5～10ml 无菌 PBS 中，离心并移去上清，同样方法洗涤细胞 1 次或 2 次。如果需要，将细胞储存于－20℃。
2. 将细胞以 1×10^8 个细胞/ml 浓度重悬于 TENC 裂解缓冲液，再加入 1/10 体积的含有 2%脱氧胆酸钠的 TENC 裂解缓冲液。涡旋振荡 20～30s，在冰上孵育 15min。
3. 4℃，720g 离心 5min，将上清（含有细胞总蛋白）转移到一个干净的试管。如果需

要，储存于－20℃或－70℃。

4. 配制变性胶（单元 12.3），用 SDS/样品缓冲液稀释裂解液并进行变性。准备蛋白质分子质量标准品，上样并电泳。如果需要的话，进行染色并拍照。

   5%～20%的变性梯度胶可将 HIV 的所有蛋白质进行最好的分离，但 10%的变性胶也是适用的。

5. 用转膜缓冲液将蛋白质从胶上电转移到硝酸纤维素滤膜上（单元 12.5）。
6. 取出硝酸纤维素滤膜并放入一个玻璃器皿或一个仅比滤膜稍大一点的可密封的塑料袋中。加入足量的 5%脱脂奶粉/1×TN 缓冲液，pH7.4，将滤膜完全浸没，室温下，在平台摇床上温和地振摇 30min 以上。
7. 倒出缓冲液，用等量的 pH7.4 的 TN-TN 缓冲液置换，振摇 5min。
8. 用新鲜配制的 3%（*V/V*）BSA/TN-T 缓冲液稀释抗 HIV 多克隆抗血清（如高滴度抗血清按 1∶100～1∶1000 稀释）。移去 TN-TN 缓冲液并用稀释的抗体溶液置换，用量要足以将滤膜完全浸没。室温下孵育 1.5h。

   多个供应商有针对 HIV 的单克隆或多克隆抗体出售（如见 Linscott's Directory，2001），或者将已知含有相对高滴度抗 HIV 抗体的 HIV 患者的血清收集并合并，也可以获得大量的多克隆抗体。

9. 用 pH7.4 的 TN-TN 缓冲液洗涤滤膜 2 次，再用 pH7.4 的 TN-T 缓冲液洗涤 2 次，每次 5min。
10. 将滤膜与含 1μl/ml [^{125}I] 蛋白 A 的 3%BSA/TN-T 缓冲液在室温下孵育 1～3h。
11. 用 pH7.4、10mmol/L EDTA/TN-T 缓冲液洗涤滤膜 3 次，用 pH7.4 的 1×TN 缓冲液洗涤 1 次。将滤膜在空气中干燥并用 X 射光胶片曝光过夜。

基本方案 2　免疫荧光法检测 HIV 蛋白

本方法可以在任何给定的时间点半定量测定培养细胞中表达病毒蛋白的活细胞的百分数，本方法适用于任何新鲜分离的或培养细胞的检测。

材料（带√项目见附录 1）

固定液：1∶1（*V/V*）甲醇/丙酮
待检测的细胞
√PBS，无菌
漂白剂（bleach）
85%～95%（*V/V*）的乙醇
人多克隆抗 HIV 抗血清
未感染个体来源的人血清
罗丹明（Sigma）
FITC-标记的羊抗人 IgG 或其他的 FITC-标记的抗人 IgG（单元 4.1 或商业化产品）
甘油
封片剂（如 Fisher）
玻璃固定器皿

台式离心机及适当的转子

载玻片（磨砂处理过的更好）和盖玻片

Cytospin-3 离心机带小盒、玻片衬纸及金属载玻片托架（Shandon/Lipshaw）

蜡笔

固定载玻片用的金属托架

平台摇床

湿盒：带架子（如移液管）及湿巾的密封盒（树脂玻璃尤佳）

暗盒，4℃

荧光显微镜，以及用于 FITC 和罗丹明的绿色和红色滤光片

1. 将约 500ml 固定液倒入一个玻璃固定器皿中并冷却至－20℃。
2. 计数培养细胞（附录 3A），将细胞悬液置于适当大小的离心管中。室温，400*g* 离心 8～10min，去上清。将细胞重悬于 5～10ml 无菌 PBS 中，再离心，弃上清，同样洗涤细胞 1～2 次。
3. 将细胞以 1×10^6～1.5×10^6 个细胞/ml 的浓度重悬于无菌 PBS 中。
4. 将一张磨砂的载玻片作好标记，按照厂商说明组装 Cytospin 装置。调节螺丝钉的紧度以保证所有组件固定牢靠而不会滑动。将玻片衬纸的小孔与 Cytospin 小室的小孔对齐以确保细胞离心时向载玻片沉集。
5. 将 100μl 细胞悬液（1×10^5～1.5×10^5 个细胞/载玻片）加入 Cytospin 小室的底部。将 Cytospin 小室放入 Cytospin-3 离心机并使离心桶平衡，在 700*g* 离心 5min。同样准备一张载玻片作为阴性对照。
6. 从 Cytospin 小室和金属托架中仔细取出载玻片，注意不要将细胞从载玻片上刮掉。将玻片衬纸视为 HIV-污染废物处置，用漂白剂及 85%～95%的乙醇依次清洗离心小室。
7. 让载玻片在空气中干燥约 20min，用蜡笔围绕载玻片上的细胞画一个圆圈。将载玻片置于金属托架上，然后将其整个放入装有－20℃固定液的固定器皿中让细胞在－20℃固定 10min。任何时间都要保持细胞湿润，细胞固定不要过度。
8. 将金属托架及载玻片移至一个干净的玻璃器皿中，其中含有足量的 PBS 足以将载玻片完全浸没，放于平台摇床上洗涤 3～5min。重复洗 1 次。
9. 洗涤细胞时，准备一抗溶液（一张载玻片需 200μl），将人多克隆抗 HIV 抗血清及从未感染个体的血清（作为阴性对照）用 PBS 按适当比例稀释（常为 1∶500～1∶1000）。
10. 从 PBS 中取出载玻片放入湿盒内。对每一张载玻片，加入足量的一抗溶液使其能完全浸没蜡笔所画的圆圈包含的区域（100～200μl）。在室温下染色30～45min。
11. 将载玻片放回金属托架并用足量的 PBS 在平台摇床上洗涤 2 次，每次 5min。
12. 准备二抗溶液（一张载玻片需 200μl），将罗丹明（复染剂）按 1∶80（*V*/*V*）用 PBS 稀释。再将 FITC-标记的羊抗人 IgG 或其他的 FITC-标记的抗人 IgG 按 1∶250 用配制的 PBS/罗丹明溶液稀释。
13. 将载玻片放回染色盒，按步骤 10，用 100～200μl 二抗溶液覆盖细胞区域。将染色盒放于暗处在室温下染色 30min。从此刻起，载玻片完全避光以避免 FITC 染料的

荧光淬灭。将 IgG 分装冻存于暗处，用铝箔将染色盒及洗涤细胞时的器皿包裹起来使载玻片免受光照。

14. 按步骤 11，用 PBS 将载玻片洗涤 1 或 2 次。去掉多余的 PBS，加 1 滴甘油至载玻片上包含细胞的区域，用盖玻片覆盖。用封片剂仔细地将盖玻片的边缘密封。将载玻片放入暗盒中在 4℃放置 15～20min 使封片剂固化。
15. 在荧光显微镜下，用 10×～40×的镜头及红色滤光片，计数一个视野中罗丹明染色的细胞（总细胞）。用绿色滤光片观察同一个视野，并计数 FITC 染色的细胞（HIV 抗原阳性的细胞）。重复计数 5 个视野（每个样品计数 200 个细胞以上）并将结果平均。
16. 计算阳性细胞百分率：（总 $FITC^+$ 细胞/总罗丹明$^+$细胞）×100。

载玻片可以放入暗盒中在－20℃保存最多 2 周，时间取决于初始染色的强度，但荧光会随时间而线性衰减。

备选方案　流式细胞仪分析细胞内 HIV 蛋白

本方法可以替代免疫印迹或免疫荧光法。本方法使用 Coulter 公司的 KC57 抗体，该抗体可以识别 HIV 核心抗原的 55kDa、39kDa、33kDa 和 24kDa 蛋白。本方法对体外感染的细胞最为有用，因为来自患者体内的感染细胞的频率常低于检测限度（<0.01%）。如果样品在 1%甲醛/PBS 溶液中处理过夜，即便是感染样品，对其进行分析也是安全的。

材料

待检测的细胞（单元 9.1～9.3）
冷的 FACS 洗涤缓冲液：PBS（附录 1）/1%胎牛血清/0.09%NaN_3
荧光染料标记的抗 HIV 抗体（如 KC57、Coulter）
Cytofix/Cytoperm Plus 试剂盒（Pharmingen）或其相当者：
　Cytofix/Cytoperm 溶液
　Perm/Wash 溶液
荧光染料标记的小鼠 IgG1 同型抗体（对照用；Coulter）
1%多聚甲醛/PBS 溶液
FACS 试管或 96 孔 V 形底的微量滴定板

1. 将活的且被有效感染的细胞（每次染色需 10^5～10^6 个细胞）收集到放置在冰上的（4～8℃）FACS 试管或 96 孔 V 形底微量滴定板里。通常，使用急性感染后 7～10d 的细胞，或取自 HIV 感染个体的 PBMC 经刺激后第 14 天的细胞。包含一个未感染的对照样品，以及对所有样品而言的一个同型抗体对照。样品的感染性可以通过检测组织培养上清中的 p24 抗原（通过 ELISA）或反转录酶活性（见基本方案 3）进行确认。
2. 用 250μl（微量滴定板）或 1ml（FACS 试管）冷的 FACS 洗涤缓冲液洗涤细胞 1 次。将细胞重悬于 50μl（滴定板）或 200μl（试管）FACS 洗涤缓冲液，用对某一细胞表面抗原（如 CD3、CD4、CD8、CD14、CD19）特异的荧光素标记的单克隆抗体约

0.5μg 在冰上染色 30min。用 FACS 洗涤缓冲液洗涤细胞 2 次。

如果抗体能够识别经固定/渗透处理的细胞表面标记，可以省略步骤 2，在固定/渗透处理后同时进行细胞表面和细胞内染色。注意，通常用于细胞表面染色的同型对照抗体在固定和透化处理后使用，可能对细胞内抗原产生非特异染色。

3. 用 100μl（滴定板）或 250μl（试管）的 Cytofix/Cytoperm 溶液重悬细胞并在冰上放置 20min。用 250μl（滴定板）或 1ml（试管）的 1×Perm/Wash 溶液洗涤细胞 2 次。
4. 将上述固定/渗透处理过的细胞重悬于 50μl 的 Perm/Wash 溶液中。加入抗体进行细胞内染色（如 10～20μl 的 KC57 抗体或 IgG1 同型抗体），在冰上于暗处孵育 30min。
5. 用 1×Perm/Wash 溶液洗涤细胞 2 次，流式细胞仪分析前将细胞重悬于 1%多聚甲醛/PBS 溶液中。

基本方案 3　HIV 反转录酶活性检测

本部分是对培养上清中病毒相关反转录酶活性的功能性检测，并以此来指示是否有病毒的存在。任何培养的原代细胞或肿瘤细胞系都适用于本检测。检测的特异性可以通过该酶对镁的严格依赖性来保证所检测的仅是 HIV 反转录酶。

材料（带√项目见附录 1）

待检测的细胞培养物
已知含有 HIV 的细胞培养上清（阳性对照，单元 9.1）
母液，室温（表 9.4.1）
10mCi/ml [α-^{32}P] dTTP（400Ci/mmol；NEN），出厂时间≤10d
√DTT
√1×SSC
85%～95%（V/V）乙醇
生物安全 II 级闪烁混合液（Research Products International）
96 孔 U 形或 V 形微量滴定板，不必无菌
多道移液器
DEAE 滤膜衬纸（Perkin-Elmer）
平皿
平台摇床
用于滤纸的塑料套（Perkin-Elmer）
β 计数仪（如 1450 Wallac Microbeta Trilux 液闪仪）

1. 从每一个待测的细胞培养物或已知含有 HIV 的细胞培养物（阳性对照）收集≥25μl 无细胞的培养上清至 96 孔 U 形或 V 形微量滴定板，每个样品做复孔。

无细胞上清可以马上使用或在－20℃或－70℃长期储存，但应避免反复冻融。储存的上清应该加盖后在实验台上或生物安全柜中逐渐解冻。

2. 计算相应量的母液（表 9.4.1，一块 96 孔板需要 5ml）。

表 9.4.1 反转录酶主混合液[a]

试剂	体积/ml	母液中各成分的浓度	反应混合物中的终浓度
蒸馏水	419.5		
1mol/L TrisCl，pH7.8	30.0	60mmol/L	50mmol/L
1mol/L KCl	37.5	75mmol/L	63mmol/L
1mol/L $MgCl_2$	2.5	5mmol/L	4.2mmol/L
10%Noidet P-40	5.0	0.1%	0.08%
0.5mol/L EDTA	2.020	2.02mmol/L	1.68mmol/L
2mg/ml PolyA（Pharmacia）	1.250	5μg/ml	4.2μg/ml
25μg/ml Oligo-dT（Pharmacia）	3.25	0.16μg/ml	0.14μg/ml

a. 反转录酶母液可以提前配制，分装为 50ml，可在－20℃或－70℃无限期储存。使用前用 37℃水浴将其解冻。

3. 每毫升母液中加入 1～2μl 新鲜的 10mCi/ml [α-^{32}P] dTTP 及 4μl 1mol/L 的 DTT。
4. 用多道移液器将 25μl 含放射性核素的已平衡至室温的母液加入干净的 96 孔板的每个孔中。包括两个阴性及两个阳性对照。

   阴性对照应含有来自未感染细胞的培养上清，在检测某些刺激剂诱导 HIV 的产生时，可将未刺激细胞的上清作为阴性对照。如果仅是平衡至室温的母液而不加入培养上清作为阴性对照会产生较高的背景，因此不建议以此作为阴性对照。阳性对照则应含有已知含 HIV 病毒的上清。为了保持并保证不同批次测试之间的一致性，可将病毒储存品扩增后分装批量冻存，每次测试时解冻一小份。如果需要用标准曲线来定量测定 HIV 的滴度，则阳性对照应该包含滴度已知的 HIV 上清的一系列稀释样品，且每个稀释度样品做复孔。

5. 用多道移液器，吸取每一待检孔上清及对照各 5μl 加入含有放射性核素的且平衡至室温的母液的微量滴定板中。在 37℃孵育 2～4h。

   注意： 用来加样的枪头有两种生物危害（潜在的 HIV 感染和 [^{32}P] 放射性核苷酸），因此不能简单地视为放射性废物处置。为了清除枪头的生物性的污染，可使其吸入漂白液并当作固体放射性废物处置。

   孵育≥2h 后，任何 HIV 几乎肯定地在混合液中 NP-40 去污剂的作用下没有感染性。因此余下的步骤可以在 BL-2 或 BL-3 实验室的工作台上进行，采取适当的放射屏蔽措施。

6. 用多道移液器，从每一孔取 6μl 反应混合液加在 DEAE 滤膜衬纸（DEAE Filtermat 1450-522）上的样品格子里。为了避免撕裂滤纸，将反应混合液滴到滤纸上并避免枪头接触滤纸。将 DEAE 滤纸晾干（约 10min）。

   注意： 为了防止工作台被放射性污染，可在其上垫一块吸收性毛巾，并且不同的板子之间需更换毛巾以避免滤纸的交叉污染。

7. 洗涤 DEAE 滤纸 5 次，每次洗涤时将滤纸放入含有可以浸没滤纸的足量 1×SSC 溶液的器皿内，放在平台摇床上振摇 5min。按同样的方式用 85%～95%的乙醇洗涤 2

次。将滤纸烘干（用干燥器或热灯泡需要 30min）。

8. 将滤纸放入塑料套中，加入 5ml 生物安全 II 级闪烁混合液，确保滤纸充分吸收闪烁液，然后用滚动器排出多余的闪烁液。密封塑料套后修剪以匹配读测盒。用 β 液闪仪读测数据。

　　所测得的 cpm 绝对值是每微升上清的量。每微升上清的总计数值与其所含的反转录酶（或病毒）的数量直接相关。

9. 用阳性及阴性对照孔的结果做标准曲线并计算待测细胞上清的 HIV 滴度。

参考文献：Davey and Lane，1990

撰稿人：Mario A. Ostrowski，Tae-Wook Chun，Sharilyn K. Stanley，and Anthony S. Fauci

单元 9.5　用 PCR 检测 HIV 的 DNA 及 RNA

对 HIV 感染的个体来说，如果怀疑其身体任何部位含有 HIV 的话，都可以从该部位取样用本方法进行检测。此外，这些方法也可以用于 HIV 体外感染细胞的检测。

注意：从 HIV 感染细胞制备核酸时应该在生物安全 3 级的设施中进行（见前言）。病毒灭活后，样品应该移至一个新的工作区域，以将交叉感染降至最低。实验过程中应使用带气溶胶屏障的移液头及无菌、无 DNase/RNase 的塑料管和水。

基本方案 1　用 PCR 扩增及检测 HIV 的 DNA

T 细胞系 ACH-2 的基因组中含有一份整合形式 HIV 的 DNA 拷贝，可以作为阳性对照。检测时所用 DNA 的质量和完整性可以通过对一个参照 DNA 序列（常用的是 β-肌动蛋白），来进行平行 PCR 扩增检测。本方法的参数对于表 9.5.1 中所给出的引物/探针组已经进行了优化。推荐使用每一组引物/探针的 PCR 反应的最佳条件。

表 9.5.1　已知用于 HIV DNA 和 RNA 扩增的 HIV 特异的引物及探针

基因产物	名称	序列	大小
LTR	RU5 5′（5′引物）[a]	5′-GGTCTCTCTGGTTAGACCAGAT-3′	180bp
	RU5 3′（3′引物）[a]	5′-CTGCTAGAGATTTTCCACACTG-3′	
	RU5-P（探针）[a]	5′-AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT-3′	
gag	SK38（5′引物）[b]	5′-ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT-3′	115bp
	SK39（3′引物）[b]	5′-TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC-3′	
	SK19（探针）[b]	5′-ATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC-3′	
LTR-gag	US 5′（5′引物）[c]	5′-TCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACA-3′	160bp
	US 3′（3′引物）[c]	5′-TCTCCTTCTAGCCTCCGCTAGTC-3′	
	US-P（探针）[c]	5′-CAAGCCGAGTCCTGCGTCGAGAG-3′	

a. Chun *et al.*，1997.

b. Ou *et al.*，1988.

c. Saksela *et al.*，1993.

材料（带√项目见附录1）

待测可能存在HIV DNA的HIV感染细胞
HIV阴性的细胞
ACH-2T细胞系（AIDS研究与参照试剂方案，no. 349）
DNA分离试剂盒（Puregene，Gentra Systems）
异丙醇
70%乙醇
√PBS
20mg/ml蛋白酶K
√细胞裂解缓冲液
HIV特异的PCR引物（表9.5.1）
√10mmol/L dNTP混合液（Perkin-Elmer）
√10×PCR缓冲液
50mmol/L $MgCl_2$
2.5U Platinum *Taq* DNA聚合酶（Life Technologies）
40pmol寡核苷酸探针（表9.5.1）
5×T4多核苷酸激酶正向反应缓冲液（随T4多核苷酸激酶一起提供）
10U/μl T4多核苷酸激酶（Life Technologies）
10μCi/μl [γ-^{32}P] ATP
1.8%（*m/V*）琼脂糖凝胶含0.5μg/ml溴化乙锭
0.5×、1×和2×SSC含0.1%（*m/V*）SDS
√杂交溶液
10mg/ml鲑鱼精DNA（Life Technologies）
56℃和94℃水浴
8连管的MicroAmp透光PCR管（PE Biosystems）
8连盖的MicroAmp透光PCR管盖（PE Biosystems）
PCR仪（如GeneAmp PCR System 9700，Perkin-Elmer）
0.5ml和1.5ml的微量离心管
Elutip-D柱（Schleicher & Schuell）
尼龙膜（Zeta Probe GT，Bio-Rad）
层析纸（Whatman）
UV交联仪（Stratagene）
玻璃杂交试管（Stovall）
杂交炉（Stovall）
塑料器皿及能盖紧的盖子
放射性磷成像系统，包括荧光屏、图像擦除器及Storm860（Molecular Dynamics）
Image Quant软件（Molecular Dynamics）

用 Puregene DNA 分离试剂盒制备基因组 DNA

1a. 将 1×10^6 个细胞在 15ml 锥形试管中以 500g 离心 10min。去除上清，仅留少量上清在试管内（如<20μl），涡旋振荡将细胞重悬。

2a. 加入 143μl 细胞裂解液（Puregene 试剂盒）。用一个大孔的枪头上下吹吸细胞将其裂解。如果还能看见细胞团块，将其在 37℃孵育直至溶液变得均一。如果需要的话，可将样品在 −80℃储存一年。

3a. 将细胞裂解物转移至一个干净的 1.5ml 微量离心管中。加入 2μl RNase A 溶液（来自 Puregene 试剂盒），颠倒管子 25 次，37℃孵育 10～30min。

4a. 将样品冷却至室温，然后加入 48μl 蛋白沉淀溶液（Puregene 试剂盒），涡旋强力振荡 20s，冰上孵育 5min。

5a. 用微量离心机以最高速度在室温下离心 5min。将上清转移至一个 1.5ml 微量离心管中并加入 143μl 异丙醇。温和地颠倒混匀管子直至可以看到 DNA 聚集物。

6a. 用微量离心机以最高速度离心 5min，弃上清，用 1ml 冷的 70%乙醇洗涤 DNA 沉淀。用微量离心机以最高速度离心 5min，吸去乙醇，让 DNA 沉淀在空气中干燥。用 20～40μl 的水溶解 DNA 沉淀，并在 4℃放置过夜使其再彻底溶解。

7a. 用分光光度计测定每个样品的 DNA 含量（A_{260}/A_{280} 的比值为 1.8 是最佳的）。调整每个样品的体积以使其 DNA 浓度标准化（通常进行 PCR 时，0.10μg/μl 的 DNA 浓度相当于 1.5×10^5 个细胞的 DNA 量）。进行步骤 8。

制备直接用于 PCR 的细胞裂解物

1b. 用 PBS 将用于 HIV 检测的细胞洗涤 2 次。

2b. 计数细胞并将 1×10^6 个细胞加入一个 1.5ml 的微量离心管中。

3b. 用微量离心机以最高速度离心 5min，弃上清。细胞立即使用或储存于 −20℃。若要无限期保存，则将其储存于 −70℃。

4b. 配备新鲜的裂解液（PK/LB），每一个样品配制 15μl 的 20mg/ml 蛋白酶 K 溶液与 500μl 的细胞裂解缓冲液的混合液。

5b. 向每一个细胞沉淀加入 500μl 新鲜的 PK/LB 溶液并涡旋振荡使其完全重悬。在 56℃水浴中孵育 1h 使细胞裂解。如果是冻存的细胞沉淀样品，也可以直接加入 PK/LB 溶液。

6b. 在 94℃水浴中孵育 15min 使蛋白酶 K 失活。立即使用裂解物进行 PCR 扩增或储存于 −20℃。若要长期保存，则将其储存于 −70℃。

7b. 进行步骤 8。

8. 按检测样品标记一系列 8 连管的薄壁 PCR 反应管，平行标记一组反应管用于 β-肌动蛋白 PCR。对每一对引物，包括 β-肌动蛋白引物，都要包含一个 HIV 阴性对照，比如来自正常供者的 PBMC，以及一个阳性对照（ACH-2 DNA 的 10 倍连续稀释样品，相当于 5000～5 个细胞）。

9. 在另一管中，配制下列母液（将下列的体积乘以总的样品数再加上 1 或 2 个样品的体积以补偿加样时的损失）：

5μl 5μmol/L 5′ 引物
5μl 5μmol/L 3′ 引物
2μl 10mmol/L dNTP 混合液
5μl 10×PCR 缓冲液
2μl 50mmol/L $MgCl_2$
0.5μl 2.5U Platinum *Taq* DNA 聚合酶
20.5μl 无菌 H_2O

涡旋振荡母液并取 40μl 加入每一个标记的管子内。

10. 加入 10μl DNA 样品（步骤 7a 或 7b）至每一个含有反应混合液的管子内，并用 8 连盖的盖子盖好。
11. 用如下参数在 PCR 仪上进行扩增：

1 个循环	2min	94℃
26～32 个循环	30s	94℃（变性）
	30s	58℃（复性）
	45s	72℃（延伸）
1 个循环	10min	72℃（终产物延伸）

循环后将样品保持在 4℃，将样品储存于－20℃直至分析。

12. 标记杂交探针，将下列试剂在一个 0.5ml 微量离心管中混合：

4μl 40pmol 寡核苷酸探针
6μl 分子级的 H_2O
4μl 5×T4 多核苷酸激酶正向反应缓冲液
1μl 10U/μl T4 多核苷酸激酶
5μl 10μCi/μl [γ-^{32}P] ATP

短暂微量离心，在 PCR 仪上先后在 37℃和 95℃分别孵育 60min 和 5min。短暂离心后置冰上冷却。用 Elutip-D 柱按照厂商说明纯化标记的探针。

13. 用标准的方法，将 PCR 扩增的 DNA 片段在含有 0.5μg/ml 溴化乙锭的 1.8%琼脂糖凝胶上进行电泳分离，拍照。用 Southern 印迹法将凝胶中的 DNA 向尼龙膜转印过夜。
14. 用含 0.1%SDS 的 2×SSC 洗膜 2 次，每次 5min，将膜置于层析纸上以去除多余的缓冲液。用 UV 交联仪按自动方式立即进行 DNA 交联。
15. 将膜置于一个玻璃杂交试管中，其中含有 10～15ml 杂交液及 100μl 10mg/ml 变性的鲑鱼精 DNA。在 50℃对膜进行至少 30min 的预杂交。
16. 去除预杂交液，加入 10～15ml 杂交液及 100μl 10mg/ml 变性的鲑鱼精 DNA 和 1×10^7cpm 标记探针。在 50℃对膜进行杂交 6h 至过夜。
17. 在一个能盖紧盖子的塑料器皿中用下列溶液依次洗膜：

2×SSC 含 0.1%SDS	2min，室温
2×SSC 含 0.1%SDS	2min，室温
2×SSC 含 0.1%SDS	30min，50℃
1×SSC 含 0.1%SDS	30min，50℃

0.5×SSC含0.1%SDS　　30min，50℃

18. 利用放射性磷成像仪对膜进行1～24h的曝光，并用Image Quant软件定量测定放射信号的强度。

基本方案2　用RT-PCR检测HIV的RNA

除了下列步骤中详细述及的对照外，RNA的质量和完整性及反转录的效率应该用一个参照基因的平行扩增来进行监测，常用β-肌动蛋白作为参照基因。

注：必须采取预防措施以避免RNA被污染的核酸酶降解。这些措施包括使用无RNase的无菌塑料制品及溶液，反转录反应时加入RNase抑制剂，在制备RNA样品和cDNA模板时使用DEPC处理过的水。为了避免PCR中的DNA污染，RNA样品用DNase进行预处理。

材料（带√项目见附录1）

用来转录非剪接形式的HIV RNA的对照质粒（SP64AH2）（带有647碱基的插入片段；Saksela *et al.*，1993）

切割质粒用的限制性内切核酸酶（及相应的缓冲液）

SP6体外转录试剂盒（如MEGAsript、Ambion）

√DEPC处理过的水

2U/μl无RNase的DNase I

√氯化锂沉淀液

70%及75%（*V*/*V*）乙醇

HIV感染细胞

HIV阴性对照PBMC

TRIzol试剂（Life Technologies）

氯仿

异丙醇

无RNase的DNase I及10×DNase缓冲液

√500mmol/L EDTA，pH8.0

10mmol/L 4dNTP混合液（Life Technologies）

50ng/μl随机六聚体（Life Technologies）

√10×RT-PCR缓冲液

25mmol/L $MgCl_2$

√1.5mol/L DTT

40U/μl重组核酸酶抑制剂（如RNaseOUT，Life Technologies）

50U/μl Superscript II反转录酶（RT；Life Technologies）

2U/μl RNase H（Life Technologies）

5μmol/L 5′引物

5μmol/L 3′引物

2.5U Platinum *Taq* DNA聚合酶

0.5ml 和 1.5ml 微量离心管
25℃、37℃、65℃和 95℃水浴
15ml 锥底离心管
8 连管的 MicroAmp 透光 PCR 管（PE Biosystems）
8 连盖的 MicroAmp 透光 PCR 管盖（PE Biosystems）
PCR 仪（如 GeneAmp PCR System 9700、Perkin-Elmer）

1. 准备用于制作标准曲线用的非剪接形式的 HIV RNA，消化一个在 3′插入了限制性内切核酸酶位点的对照质粒使其线性化，然后用酚抽提及乙醇沉淀进行纯化。
2. 在一个 0.5ml 微量离心管中加入下列试剂（转录试剂盒提供）：
   2μl 10×反应缓冲液
   2μl 50mmol/L ATP
   2μl 50mmol/L CTP
   2μl 50mmol/L GTP
   2μl 50mmol/L UTP
   2μl 酶混合液
   1μg 线性化的质粒 SP64AH2
   DEPC 处理过的 H_2O 至 20μl
   37℃孵育 2～6h。
3. 向反应管中加入 1μl 的 2U/μl 无 RNase 的 DNase I，用手指轻弹混匀，短暂离心，37℃孵育 15min。
4. 用 30μl DEPC 处理过的水及 25μl 氯化锂沉淀液进行 RNA 沉淀。−20℃孵育 30min。
5. 用微量离心机在 4℃，最高速度离心 15min，吸去上清，用冷的 70%乙醇洗涤沉淀 1 次。用微量离心机离心 10min，让 RNA 沉淀在空气中干燥，重悬于 100μl DEPC 处理过的水中。RNA 可在−80℃储存长达一年。
6. 用分光光度计测定 RNA 的浓度。估计该浓度下相应的拷贝数，进行 10 倍的系列稀释以得到 5×10^4、5×10^3、5×10^2、5×10^1、5×10^0 RNA 拷贝/μl 的稀释样品。

   重要提示：下列所有步骤均用于制备 HIV 感染的样品及 HIV 阴性对照 PBMC。

7. 制备样品 RNA，将 5×10^6个细胞在 15ml 的锥底离心管中以 500g 离心 10min。去除上清，仅留少量于试管中（<20μl）。涡旋振荡以重悬细胞沉淀并将其转移至 1.5ml 微量离心管中。
8. 加入 1ml TRIzol 试剂，反复吹吸以裂解细胞，室温孵育 5min。
9. 加入 0.2ml 氯仿，强力振摇 15s，室温孵育 2～3min。
10. 用微量离心机在 4℃，最高速度离心 10min。将上层水相转移至干净的试管中，加入 0.5ml 异丙醇，涡旋振荡，室温孵育 10min。
11. 用微量离心机在 4℃，最高速度离心 10min。弃掉上清，加入 1ml 75%乙醇，涡旋振荡。
12. 用微量离心机在 4℃，最高速度离心 10min。弃掉上清，让沉淀在空气干燥，重悬于约 20μl DEPC 处理过的水。按步骤 6 测定 RNA 的浓度。
13. 向 2μg RNA 中加入 1μl 10×DNase 缓冲液及 2U 无 RNase 的 DNase I，用 DEPC 处

理过的水将体积补足到 10μl，37℃孵育 5min。

14. 加入 1μl 25mmol/L 的 EDTA，pH8.0，并在 65℃加热 10min 以终止反应。按照步骤 4～6，用氯化锂沉淀 RNA。
15. 制备 cDNA，用 0.5ml 微量离心管，准备 2 套下列 RNA/引物混合液，分别标记为 RT^+ 和 RT^-：

    2μg RNA 样品

    1μl 10mmol/L 4dNTP 混合液

    1μl 50ng/μl 随机六聚体

    DEPC 处理过的 H_2O 至 10μl

    65℃孵育 5min 然后置于冰上至少 1min。
16. 按下列加样顺序制备母液。将下列体积乘以样品总数，再多加 1 或 2 份以补偿加样时的损失：

    2μl 10×RT-PCR 缓冲液

    4μl 25mmol/L $MgCl_2$

    2μl 0.1mol/L DTT

    1μl 40U/μl RNase 抑制剂
17. 向步骤 15 中每一份 RNA/引物混合液加入 9μl 母液，温和地混匀，短暂离心，25℃孵育 2min。
18. 向标记为 RT^+ 的离心管中加入 1μl 50U/μl Superscript II，25℃孵育 10min，42℃孵育 50min，70℃孵育 15min 以终止反应。将离心管置于冰上冷却，短暂离心。
19. 向每个离心管加入 1μl 2U/μl RNase H 并在 37℃孵育 20min。
20. 准备下列母液用于扩增。将下列体积乘以样品总数，再多加 1 或 2 份以补偿加样时的损失：

    5μl 5μmol/L 5′ 引物

    5μl 5μmol/L 3′ 引物

    2μl 10mmol/L dNTP 混合液

    5μl 10×PCR 缓冲液

    2μl 50mmol/L $MgCl_2$

    0.5μl 2.5U Platinum *Taq* DNA 聚合酶

    28.5μl 无菌 H_2O

    涡旋振荡反应混合液并取 48μl 加入每一个标记的 PCR 管内。
21. 将来自步骤 19 的 cDNA 样品 2μl 加入至每一个含有反应混合液的 PCR 管中，并盖好盖子。
22. 用如下参数在 PCR 仪上进行扩增：

1 个循环	2min	94℃（变性）
26～32 个循环	30s	94℃（变性）
	30s	60℃（复性）
	45s	72℃（延伸）
1 个循环	10min	72℃（终产物延伸）

循环后将样品保持在 4℃。将样品储存于 −20℃ 直至分析（见基本方案 1，步骤 12～18）。

参考文献：Chun *et al.*，1997

撰 稿 人：Susan Moir and Tae-Wook Chun

单元 9.6　体外评价各种制剂的抗 HIV 活性

目前，有多种方法可以用来评价抗病毒制剂在 HIV 相关疾病中的潜在用途（表 9.6.1）。

表 9.6.1　评价抗病毒制剂的抗 HIV 活性的方法

方法描述	方案
保护靶 T 细胞免受 HIV 致细胞病变作用	基本方案 1
抑制 $CD4^+$ HeLa 细胞合胞体斑的形成	基本方案 2
抑制经 ELISA 法测定的病毒 p24 gag 蛋白的产生	基本方案 3
测定靶细胞产生的反转录酶活性	单元 9.4
检测可疑靶细胞中 HIV DNA 或 RNA 的合成	单元 9.5

注意：当使用人血液、细胞或感染物时，必须遵循生物安全操作规程（见前言）。

注：除非特别说明，所有的培养都是在 37℃，含 5%CO_2的加湿培养箱中进行。

基本方案 1　保护靶 T 细胞免受 HIV 致细胞病变效应

材料（带√项目见附录 1）

ATH8（HTLV-1 转化的破伤风类毒素特异的 $CD4^+$ T 细胞克隆；Mitsuya *et al.*，1985b）或类似的易受 HIV 致细胞病变作用的靶 T 细胞

√用于培养细胞系并含有 IL-2 的培养基

无细胞的 HIV 制品或 γ 射线照射过的 HIV-感染细胞（AIDS 研究与参照试剂方案），按单元 9.1～9.3 制备

待测试的抗病毒制剂

50ml 聚丙烯锥底试管（Falcon）

10ml 聚苯乙烯组织培养试管（Falcon）

Sorvall RC3B 离心机带 H-2000 转头（或其他同类相当产品）

1. 将 1.6×10^6 ATH8 靶细胞（够 8 次实验用）分别加入标为 A 和 B 的 2 个 50ml 锥底试管中在室温下，600*g* 离心 5min。弃掉每一管的上清。

   其他可用的 HIV-敏感的细胞系可以从 AIDS 研究与参照试剂方案中获得。包括（及其产品编号）MT2（no. 237）、CEM-SS（no. 76）、H9（来自 HUT78；no. 87）和 Molt-4（no. 118）。也可以使用正常克隆化的辅助 T 细胞，但它们需要更长的时间才会被病毒摧毁。

2. 向 A 试管中的细胞沉淀加入含有已知剂量的病毒接种物（如 200～5000 $TCID_{50}$）及

含 IL-2 的培养基。盖好盖子，轻弹试管直到细胞块完全分散开并使细胞和病毒混匀。向 B 试管加入只含 IL-2 而不含病毒的同样体积的培养基，同样地轻弹使细胞块分散。将 2 个试管孵育 45～60min。

3. 向 2 个试管中各加入 16ml 含 IL-2 的培养基重悬细胞。
4. 将 A 试管中病毒处理过的细胞分别取 2ml（含有 2×10^5 ATH8 细胞）加入到 5 个 10ml 聚苯乙烯组织培养试管中。将 B 试管中模拟处理的对照细胞做同样处置。
5. 将不同浓度的抗病毒制剂加入 3 个含有病毒处理过的细胞的试管中。如果最佳浓度未知，从浓度为 1μmol/L、10μmol/L 和 100μmol/L（终浓度）开始。向剩下的 2 个试管中加入不含抗病毒制剂的基质溶液（对照）。将模拟处理的对照细胞做同样处置。将所有培养物孵育 4～8d，并观察 ATH8 细胞自发形成的细胞团块。

   对于那些进入靶细胞极慢的制剂或只能在靶细胞外面起作用的中和抗体而言，靶细胞应该在接触病毒之前先用这些制剂处理（如预处理 2～5h）。

6. 培养第 3 天及以后，检测 ATH8 细胞团块大小的变化，包括感染的及模拟感染的培养物。

   对 MT2 细胞或别的细胞来说，应在倒置显微镜下检查细胞形态的变化（如合胞体的形成），因为这些细胞不形成明显的细胞沉块。

7. 当细胞沉块的大小变得显著不同时，如当病毒处理过的细胞团块呈现出瓦解状并含有细胞碎片时(第 6 天)，用台盼蓝拒染法（附录 3C）及血细胞计数板计数存活的 ATH8 细胞。
8. 用下列公式计算受抗病毒制剂保护的暴露于 HIV 的靶细胞存活及生长百分率：

$$100\times\left\{\frac{(n_{暴露+抗病毒剂})-(n_{暴露-抗病毒剂})}{(n_{对照})-(n_{暴露-抗病毒剂})}\right\}$$

   式中，$n_{暴露\pm抗病毒剂}$ 表示暴露于 HIV 的培养物分别在含有抗病毒剂或不含抗病毒剂情况下存活的细胞数；$n_{对照}$ 表示的是单独的培养物中存活的细胞数。使用这一公式，当暴露于 HIV 和抗病毒剂的培养物存活的细胞数与未暴露于病毒和抗病毒剂的培养物存活细胞数相同时，则计算值为 100%。

   保护作用也可以用抗病毒制剂抑制 50%或 90%的病毒致细胞病变效应时抗病毒剂的浓度来表示（IC_{50} 或 IC_{90}，见辅助方案）。

9. 用下列公式计算抗病毒制剂对靶细胞生长的细胞毒性作用百分率：

$$100\times\left\{1-\frac{(n_{对照+抗病毒})}{(n_{对照-抗病毒剂})}\right\}$$

   式中，$n_{对照+抗病毒剂}$ 表示含有抗病毒剂的培养物中存活的细胞数；$n_{对照-抗病毒剂}$ 表示未暴露于病毒和抗病毒剂的培养物的存活细胞数。

基本方案 2　表达 CD4 的 HeLa 细胞合胞体斑形成抑制试验

注： 如果要用 PBMC 来检测抗病毒易感性，必须先分离得到病毒储存品，并测定其对 PBMC 的感染性滴度（单元 9.1）。

材料（带√项目见附录 1）

HT4-6C 细胞（AIDS 研究与参照试剂方案），无支原体（附录 3F）

胰酶-EDTA（GIBCO）

√DMEM-10 完全培养基（维持培养基）

√空斑测试培养基，含 HIV 储存品，且滴度在 HT4-6C 细胞中用连续稀释法测定过，或含待测试的抗病毒剂

100%（*V/V*）甲醇

0.3%（*V/V*）结晶紫，用蒸馏水配制后过滤（如用咖啡滤器过滤）

70%（*V/V*）乙醇

24 孔组织培养板（Falcon）

倒置显微镜

1. 用胰酶-EDTA 消化 HT4-6C 细胞 8～10min。室温，300*g* 离心 10min。将细胞重悬于 5～10ml 维持培养基中。计数细胞并稀释到 2.5×10^4～3×10^4 个细胞/ml，按所需的 24 孔板数量计算需要细胞的足量体积。
2. 快速且平稳地将 1.0ml 经胰酶消化过的细胞铺于 24 孔板的每一孔中。用不溶于乙醇的记号笔标记每一块培养板，并培养过夜（实验开始时，每一孔的表面仅约 20%有细胞覆盖）。
3. 吸去培养基，向每一孔中加入 200μl 含有 100 空斑形成单位的（plaque-forming unit，PFU）病毒空斑测试培养基，孵育 2h。
4. 加入 800μl 空斑测试培养基，其中含有 1.25×终浓度的待测抗病毒剂。每一个药物稀释度设置复管（通常做 10 倍或 0.5log10 即 3.16 倍稀释），孵育 3d。

   对某些抗病毒剂（如干扰素或中和抗体）来说，病毒感染细胞前需要先培养抗病毒剂与细胞或病毒。
5. 用 100%甲醇浸没培养板 15min，然后沥干并用水冲洗。

   使培养板不再有生物危害性，而板中的单层细胞也是长期稳定的；步骤 6 可以在任何时候进行。
6. 加入 0.5ml 0.3%结晶紫至每一孔中，室温孵育 5min。用水充分冲洗板并晾干。计数空斑前用 70%乙醇去除孔外表面的水痕。
7. 用倒置显微镜计数每一孔的空斑数。为便于计数可用记号笔画 4 条平行线将每一个孔分成 5 个分区。
8. 用空斑减少的百分率对药物浓度的对数作图。从图上手工计算 50%抑制浓度（IC_{50}）或用半数-效应方程式（见辅助方案）计算 IC_{50}。

   表 9.6.2 列出了一些测得的 IC_{50} 值。

表 9.6.2　HIV-1 参照株及从未治疗患者临床分离株测得的 IC_{50} 值

测试方法	药物浓度/（μmol/L）[a]		
	AZT	ddC	ddI
合胞体形成	0.001～0.045	0.01～0.4	0.1～4.0
基于 PBMC	0.002～0.18	0.03～0.3	0.06～4.0
抗药性株[b]	5～10	1～5	10～30

a. 缩写：AZT，3′-azido-2′，3′-dideoxythmidine，3′-叠氮-2′，3′-双脱氧胸腺嘧啶（zidovudine，叠氮胸苷）；ddC，2′，3′-dideoxycytidine，2′，3′-双脱氧胞嘧啶；ddI，2′，3′-dideoxyinosine，2′，3′-双脱氧肌苷。

b. 代表试验的最高的无毒性浓度。

基本方案3　ELISA检测抗病毒剂对PBMC中HIV p24抗原产生的抑制作用

本方案所使用的HIV分离物是通过将HIV-感染个体的PBMC与未感染个体的经PHA刺激过的PBMC共培养而产生的。也可以使用HIV-1许可细胞系。检测p24的ELISA试剂盒有多种可供选择。单元9.4介绍了免疫荧光法检测p24 gag蛋白的方法。

材料（带√项目见附录1）

HIV-血清反应阴性（正常）供者的经PHA刺激过的PBMC

√含5%（V/V）IL-2的培养基

√PBS，无菌

含病毒的上清，通过将HIV-血清反应阳性血液的PBMC与HIV-血清反应阴性（正常）供者的经PHA刺激过的PBMC共培养而产生（单元9.1）

消毒剂（如10%漂白剂）

洗涤培养基：RPMI 1640培养基（GIBCO），无血清及其他添加剂

抑制化合物（如1mmol/L AZT储存液），用无菌PBS配制后小量分装，并用硼硅酸玻璃保存于－20℃

96孔平底或圆底的微量滴定板

p24 ELISA板（Coulter，DuPont）

1. 将1.2×10^7个来自HIV-血清反应阴性（正常）供者的经PHA刺激过的PBMC置于3ml的IL-2培养基中（终浓度为4×10^6个细胞/ml）。在37℃孵育直至步骤4使用。
2. 按照图9.6.1的标示设置一个96孔微量滴定板。向外围的孔中加入200μl的PBS。向第2列的从B到G的孔中加入183μl的IL-2培养基。向第3至第8列中从B～G

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
样品A	B	P	4^{-2}	4^{-3}	4^{-4}	4^{-5}	4^{-6}	4^{-7}	4^{-8}	P	P	P	P
	C	P	4^{-2}	4^{-3}	4^{-4}	4^{-5}	4^{-6}	4^{-7}	4^{-8}	P	P	P	P
	D	P	4^{-2}	4^{-3}	4^{-4}	4^{-5}	4^{-6}	4^{-7}	4^{-8}	P	P	P	P
	E	P	4^{-2}	4^{-3}	4^{-4}	4^{-5}	4^{-6}	4^{-7}	4^{-8}	P	P	P	P
样品B	F	P	4^{-2}	4^{-3}	4^{-4}	4^{-5}	4^{-6}	4^{-7}	4^{-8}	P	P	P	P
	G	P	4^{-2}	4^{-3}	4^{-4}	4^{-5}	4^{-6}	4^{-7}	4^{-8}	P	P	P	P
	H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

图9.6.1　检测病毒感染滴度的设置格局。含PBS的孔标记为P。数字标识孔表示每一个病毒储存样品的连续4倍稀释样。该格局表示的是测试2个样品的设置。

的孔中加入 150μl 的 IL-2 培养基。

3. 将含有病毒的上清储存品快速解冻并各取 17μl 加入到第 2 列中的 B、C 和 D 孔中。更换枪头，温和地将 B、C 和 D 孔中的病毒和培养基混匀。从第 2 列转移 50μl 到第 3 列。更换枪头，将第 3 列中的病毒和培养基混匀，并转移 50μl 到第 4 列。重复转移及稀释直到第 8 列。将第 8 列各孔取出 50μl 弃于含有消毒剂的废料桶中。在 E、F 和 G 行中对第 2 个病毒样品重复上述稀释过程。

   对于滴度非常高的病毒储存品，需要进一步的稀释。

4. 向第 2 至第 8 列中的 B～G 各孔加入 50μl PHA 刺激过的 PBMC（来自步骤 1），从右向左移动。盖好板盖培养 3～4d。
5. 从右向左重悬每一孔中的细胞，将第 2 至第 8 列中的 B～G 各孔悬液弃掉 125μl 细胞悬液以维持最佳生长的浓度。
6. 向每一孔中加入 150μl 新鲜的 IL-2 培养基，从右向左加。培养 3d。
7. 准备一块 p24 ELISA 板，加入 80μl 的 IL-2 培养基和 20μl 的裂解缓冲液到每一孔中（相应于样品板）。将 100μl 上清转移到 ELISA 板的适当孔中（样品将不再有生物危害性）。
8. 按照厂商说明对每一孔进行 p24 抗原的 ELISA 测定。将未校正的 p24 抗原测定值乘以 2 以校正稀释因子。如果某一孔的校正 p24 抗原值＞50pg/ml，则将该孔计为阳性；如果其校正值≤50pg/ml，则计为阴性。
9. 通过 Spearman-Karber 方程计算 $TCID_{50}$ 来测定每一个病毒储存样品的感染性：

$$TCID_{50}/ml = 5 \times 4^{M}$$

   式中，$M = X_K + d\,[0.5 - (1/n) \times \sum r]$；$X_K$ 是最高稀释度的剂量；$\sum r$ 是阴性孔的数量；n 是每一个稀释度的孔数；d 是稀释度之间的间距。对于上述设置格局的滴定板而言，$M = 8.5 - (\sum r)/3$。

10. 开始检测时，将 500μl（5×10^6 个细胞）来自 HIV-血清反应阴性（正常）供者的经 PHA 刺激过的 PBMC 置于一个 15ml 锥底试管中。加入所需的最少体积量（≤2ml 终体积）的含有病毒的上清（5000 $TCID_{50}$），温和地混匀并培养 1h。
11. 上述培养期间，配制 2×AZT 溶液，将 1mmol/L 的 AZT 用 IL-2 培养基稀释，使其浓度分别为 0.002μmol/L、0.02μmol/L、0.2μmol/L 和 10.0μmol/L。
12. 如果需要，去除未吸附的病毒：用洗涤培养基将病毒/细胞相互作用的体积补足到 12ml。盖紧盖子，室温，300g 离心 10min。小心移除上清，不要扰动细胞。重悬于 2.5ml 新鲜的 IL-2 培养基（终浓度为 2×10^6 个细胞/ml）。
13. 按照图 9.6.2 的标示设置一个 96 孔平底微量滴定板。向外围的孔中加入 200μl 的 PBS。向第 2 列的 C、D、E 和 G 孔中加入 100μl 的 IL-2 培养基。向第 3 列至第 7 列的 C、D、E 和 G 孔中加入 100μl 的 2×AZT 溶液。将剩余的 2×AZT 溶液储存于－20℃直至步骤 16 使用。
14. 向第 2～7 列的 C、D 和 E 行各孔中加入 100μl 来自步骤 10 的感染细胞。
15. 将 2.4×10^6 个来自 HIV-血清反应阴性（正常）供者的经 PHA 刺激过的 PBMC 重悬于 1200μl 的 IL-2 培养基中。向第 2 至第 7 列的 G 行孔中各加入 100μl 的细胞悬液。培养 3～4d。如果需要，用显微镜镜检细胞病变的情况。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
B	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
C	P	0	0.001	0.01	0.1	1.0	5.0	P	P	P	P	P
D	P	0	0.001	0.01	0.1	1.0	5.0	P	P	P	P	P
E	P	0	0.001	0.01	0.1	1.0	5.0	P	P	P	P	P
F	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G	P	0	0.001	0.01	0.1	1.0	5.0	P	P	P	P	P
H	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

图 9.6.2 AZT 药敏检测板的设置格局。含 PBS 的孔标记为 P。数字标识的孔表示培养基中 AZT 的浓度（μmol/L）。对于已知无毒性的浓度组的药物处理，可以省略未感染对照组。如果还要在这块板子上检测别的药物，修改设置格局即可。

16. 配制 1×AZT 溶液，用 IL-2 培养基按 1∶1 稀释 2×AZT 溶液即可。从所有孔中移除 125μl 悬液，并补充 150μl 1×AZT 溶液，孵育 3d，显微镜检测细胞病变的情况。

    如果培养 3～6d 后可以看见细胞病变，则收集病毒时病毒复制高峰期已经过去了，因此药物敏感的病毒可能会被漏掉。

17. 准备 2 块 96 孔平底微量滴定板，每一孔中加入 230μl 的 IL-2 培养基。将板标记为 B 和 C（稀释板）。

18. 从 A 板（测试板）的 C、D 和 E 排的各孔中转移 20μl 上清至 B 板（最终稀释为 1∶12.5），混匀，然后将 B 板上清转移 20μl 至 C 板（最终稀释为 1∶156）。

    培养板应紧密包裹以防止蒸发。将板保存于－20℃或－70℃，保存在聚苯乙烯板中可能会使 p24 抗原吸附到塑料壁上。最好在 48h 内进行 p24 的 ELISA 检测（步骤 20）。

19. 计数 G 行中的细胞数，并用台盼蓝拒染法测定细胞活力（附录 3C）。

20. ELISA 测定 p24 抗原并用半数-效应方程（见辅助方案）计算 50%抑制浓度（IC_{50}）。

    如果测试中无药物处理对照组所测得的 p24 抗原≤50ng/ml，则该次测试所得的 IC_{50} 与测得较高 p24 抗原的测试所得的 IC_{50} 不具有可比性。表 9.6.2 列出了一些测得的 IC_{50}。

    当培养上清从 C 板转移到 ELISA 板则最终稀释为 1∶750～1∶3000。最佳的最终稀释度须预先测定以使得对照孔的光密度为 1.5～2.5。使用本方案，大多数测试可以用一个稀释度的稳定的 p24 抗原测定值进行评估。

辅助方案 50%抑制浓度（IC_{50}）的计算

半数-效应方程有两种使用方式。使用指数形式的半数-效应方程时用非线性回归对

数据点（f_a和药物浓度）进行曲线拟合：

$$受影响的分数(f_a)=1/[1+(IC_{50}/药物浓度)^m]$$

式中，m＝曲线的斜率。

$$受影响的分数(f_a)=\%与未处理对照组比较减少的值\times 0.01$$

Systat 5.1 程序（见 Systat，附录 4）用非线性回归模型可以同时求出 IC_{50}及 m。当方程的常数（IC_{50}及 m）求出后，可以用药物浓度为 x 轴（对数尺度），f_a为 y 轴进行对数-线性绘图得出一条曲线。

或者，使用对数形式的半数-效应方程，可以用线性回归对数据点进行曲线拟合：

$$\log(f_a/f_u)=m\log[药物浓度]-m\log[IC_{50}]$$

$$受影响的分数(f_a)=\%与未处理对照组比较减少的值\times 0.01$$

$$未受影响的分数(f_u)=\%最大值\times 0.01$$

Chou 和 Chou（Biosoft）的“用微型计算机进行剂量-效应分析”是用线性回归来计算 IC_{50}从而解决对数形式的半数-效应方程的数据最佳拟合问题。当 f_a/f_u的实测值和药物浓度的对数在对数-对数坐标上绘图时，IC_{50}就是当 $y=1$ 时对应的药物浓度。Chou 和 Chou 软件绘图是在线性坐标上用 log（f_a/f_u）对 log（药物浓度）作图，IC_{50}就是 y 轴上的截距（因为 $\log 1=0$）。然而使用这一方法时，f_u不能为零，如果当药物浓度较低而没有可见的效应时，就必须将其转化成一个人为的数字。

还有其他软件可用于①指数形式方程的非线性回归模型，②对数形式方程的线性回归模型，或者③解方程求出 IC_{50}后，用 f_a(或 f_u)对药物浓度绘图。

参考文献：Mitsuya *et al*.，1991；Richman，1993

撰 稿 人：Douglas D. Richman，Victoria A. Johnson，Douglas L. Mayers，Takuma Shirasaka，Mary C. O’Brien，and Hiroaki Mitsuya

单元 9.7　基于痘苗病毒报道基因细胞融合检测法定量功能性测定 HIV 包膜糖蛋白与受体的相互作用

在这一细胞融合检测方法中，待研究的包膜蛋白表达于一种细胞（效应细胞），而 CD4 和辅助受体（趋化因子受体 CCR5 或 CXCR4）表达于另外一种细胞（靶细胞）。在一种细胞的细胞质表达噬菌体 T7 RNA 聚合酶，将连接有 T7 启动子的 *E. coli LacZ* 报道基因导入另一种细胞的细胞质来进行细胞融合检测。细胞融合将导致细胞质的混合从而活化报道基因的转录。用非离子去污剂处理的细胞裂解物进行比色法测定 β-半乳糖苷酶（β-gal）。用痘苗表达技术的一个主要优点是它可广泛用于哺乳动物细胞及非哺乳动物细胞。而且，可以使用表达内源性受体（CD4，辅助受体，或兼而有之）的靶细胞。

注意：痘苗病毒有可能在健康人体造成损害而在免疫受损的个体则有可能导致严重的病变。如果意外感染了编码 HIV 蛋白的重组痘苗病毒可能引起血清转化并在 HIV 感染诊断时得出假阳性结果。必须遵循生物安全 2 级（BL-2）操作规程并使用 I 类或 II 类生物安全柜（见前言）。由疾病控制中心提供的痘苗对直接操作该痘苗的人员来说应当被视为感染性材料。

注： 所有与细胞接触的溶液和器材必须是无菌的，整个过程都要无菌操作。除非特别说明，所有的培养都是在 37℃，含 5%CO_2 的加湿培养箱中进行。除非另外指明，其余步骤都是在室温下进行。

基本方案　用质粒表达包膜蛋白及受体进行融合检测

当包膜蛋白、CD4 和辅助受体由质粒编码时，可以在细胞质中直接表达（质粒不需要进入细胞核及整合到基因组）。然而，质粒转染的低效率会限制基因的表达水平及均一性，而且也仅能用于单层细胞。通过使用表达所有遗传元件的重组痘苗病毒可以克服这些潜在的问题（见备选方案 1）。表 9.7.1 扼要列出了这两种方法的实验步骤。

表 9.7.1　用质粒或基于重组痘苗病毒进行细胞融合检测的时间进程

从质粒表达融合组分及受体	从重组痘苗病毒表达所有蛋白质
第 1 天	
接种细胞铺于培养瓶中	将细胞铺于培养瓶中（仅用于单层细胞感染）
第 2 天	
将含有包膜蛋白、连接到痘苗启动子的 CD4 和辅助受体 cDNA（用单层细胞时）的质粒进行转染	重组痘苗病毒感染（悬浮或单层细胞）
用接于痘苗启动子后编码 T7 RNA 的聚合酶及接于 T7 启动子后编码 β-gal 的重组痘苗病毒感染（悬浮或单层细胞）	过夜表达蛋白（悬浮或单层细胞）
过夜表达蛋白（悬浮或单层）	
第 3 天	
细胞洗涤与计数	细胞洗涤与计数
细胞混合用于融合检测	细胞混合用于融合检测
检测报道基因活性	检测报道基因活性

对所有融合检测的阴性对照而言，可用编码不能切割的无融合活性的 Unc 包膜蛋白的质粒，或在一个单独的试管中用表达 CD4 或辅助受体的细胞进行融合。对于背景对照，用单一的细胞（特别是导入 *LacZ* 基因的细胞）稀释到同样的体积并与融合样品一起培养。

材料（带√项目见附录 1）

细胞
√EMEM-2.5 和 EMEM-10
含下列元件的质粒（表 9.7.2）：
　　痘苗启动子控制的包膜蛋白基因
　　痘苗启动子控制的 CD4
　　痘苗启动子控制的辅助受体（如 CCR、CXCR4）
　　阴性对照包膜蛋白（Unc）
转染缓冲液：20mmol/L HEPES，pH7.4（在 4℃可存放数周）

DOTAP 转染试剂（1，2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane；1，2-二油酰基-3-甲铵丙烷；Boehringer Mannheim）

0.25%（*m/V*）胰酶/0.02%（*m/V*）EDTA，溶于无钙和镁的 HEPES 缓冲液（Quality Biochemicals）

重组痘苗病毒，经纯化或原液，通过下列的质粒转移载体同源重组而得（表 9.7.2）：

痘苗启动子控制的 T7 RNA 聚合酶

T7 启动子控制的报道基因（*E. coli LacZ*）

25cm² 组织培养瓶

12mm×75mm 聚苯乙烯试管

50ml 锥底聚丙烯试管

杯形超声仪

96 孔平底组织培养板（Costar）

表 9.7.2　用于 HIV 包膜蛋白介导的细胞融合检测的重组痘苗病毒

表达的蛋白质	重组痘苗病毒	启动子	强度[a]	复制时期[b]	注释	参考文献
HIV 包膜蛋白						
LAV	vCB-41	合成的痘苗	高	早及晚期	使用 CXCR4	Broder and Berger（1995）
Ba-L	vCB-43	合成的痘苗	高	早及晚期	使用 CCR5	Broder and Berger（1995）
89.6	MVA/89.6	H5 修饰的痘苗	高	早及晚期	使用 CCR5、CXCR4	Belyakov *et al*.（1998）
Unc	vCB-16	合成的痘苗	高	早及晚期	不可切割	Broder and Berger（1995）
受体						
CD4	vCB-3	合成的痘苗	高	早及晚期	主受体	Broder *et al*.（1993）
CXCR4	vCBYF1-融合	合成的痘苗	高	早及晚期	辅助受体	Feng *et al*.（1996）
CCR5	vvCCR5-1107	痘苗 7.5K	中	早及晚期	辅助受体	Xiao *et al*.（1999）
报道基因						
T7 RNA	vTF7-3	痘苗 7.5K	中	早及晚期		Fuerst *et al*.（1986）
聚合酶	vP11T7 基因 1	痘苗 11K	中	早及晚期		Alexander *et al*.（1992）
β-gal	vCB21R-LacZ	T7	高	晚期	连在启动子后的 *LacZ* 基因	Alkhatib *et al*.（1996a）

a. 强度指的是表达水平。

b. 痘苗病毒复制周期中启动子处于活化状态的某一阶段。

1. 转染前一天，将细胞（人源或非人源细胞）用 EMEM-2.5 培养基铺于 25cm² 的组织培养瓶中，培养至长满一半（通常过夜即可）。对于效应细胞，则选择不表达内源性 CD4 和辅助受体的细胞类型（以避免细胞群体内的融合）。
2. 对于效应细胞，将 5μg 含有受痘苗启动子控制的包膜蛋白基因质粒 DNA 加到一个 12mm×75mm 的聚苯乙烯试管中。对于靶细胞，将含有受痘苗启动子控制的 CD4 和辅助受体基因质粒 DNA 各 5μg 加到另一个聚苯乙烯试管中。用转染缓冲液将每个试管中的总体积补足到 50μl。
3. 取两个新的聚苯乙烯试管，向每一管中加入 30μl DOTAP 转染试剂和 70μl 转染缓冲

液。将步骤 2 中一个 DNA 试管中的内容物加到一个 DOTAP 试管中（反之亦可），将剩下的一个 DNA 试管及 DOTAP 试管的内容物加到一起。室温下孵育 10min。向每个试管逐滴加入 EMEM-2.5 至总体积 2.5ml。

4. 吸去含有细胞的培养瓶中的培养基（步骤 1），分别加入靶或效应 DNA/DOTAP/EMEM-2.5 混合液，培养 3～6h。
5. 吸去转染混合液。加入 1ml 0.25%（*m/V*）胰酶/0.02%（*m/V*）EDTA 至每一个培养瓶中，约 5min 后，用力拍培养瓶使细胞掉下来，再加入 3ml EMEM-2.5 稀释胰酶。
6. 将每一份细胞悬液转移到一个 50ml 的锥底聚丙烯试管中并计数（附录 3A）。
7. 室温，400*g* 离心细胞 10min。将细胞以 1×10^7 个细胞/ml 的浓度重悬于 EMEM-2.5 培养基中。

8a. 对于纯化的痘苗病毒：计算以 MOI 为 10 时进行感染所需的 T7 RNA 聚合酶病毒及 *LacZ* 病毒储存品的量。37℃水浴快速解冻足量的病毒储存品然后转移到冰水上。将含有痘苗病毒的试管放入含有冰水浴的杯形超声仪中，以最大功率超声 30s，然后放回冰水上。

8b. 对于痘苗病毒原液：用 EMEM-2.5 稀释适量的病毒原液储存品，最少稀释到 25μl。加入等体积的胰酶/EDTA，37℃水浴孵育 30min，每隔 5min 涡旋振荡一次。按步骤 8a，将病毒/胰酶混合液超声。

9. 按每一个病毒的 MOI 为 10 的量，将 *LacZ* 病毒加到效应细胞，T7 RNA 聚合酶病毒加到靶细胞（反过来将细胞加入相应的病毒中亦可）。培养 1～2h，期间摇动数次。将未用的病毒先放回干冰中然后在－80℃保存。
10. 用多个 50ml 聚丙烯试管，将感染的细胞以 2.5×10^5 个细胞/ml 浓度重悬于 EMEM-2.5 培养基，每个试管最多含 20ml 悬液。转入一个 31℃，5% CO_2 的加湿培养箱中，将试管以尽量接近水平的角度放置并将盖子拧松以便进行充分的气体交换。31℃（或 37℃，4～8h）培养过夜（10～16h）使其表达外源蛋白。
11. 在室温下，分别将效应细胞和靶细胞 400*g* 离心 10min。再用小体积 EMEM-2.5 重悬细胞并用血细胞计数板计数。
12. 再次离心细胞，用 EMEM-2.5 重悬细胞，终浓度为 1×10^6 个细胞/ml。
13. 将 100μl 效应细胞和 100μl 靶细胞悬液加入 96 孔平底组织培养板中，做复孔。用枪头将样品温和地混匀。在室温下，400*g* 离心培养板 1min，培养 2～3h。
14. 测定细胞融合-依赖的报道基因活性（见辅助方案 1 或 2）。

备选方案 1　用重组病毒对各种成分的融合试验

作为质粒转染的替代方法，细胞融合相关成分的基因也可以用相应的重组痘苗病毒来表达（表 9.7.2）。为了在悬浮细胞或单层细胞中获得均一的高水平表达，可以使用 MOI 足够高的病毒。这一方法主要的不便之处是另需产生重组痘苗病毒。用于单层细胞时，按照上述方法培养细胞（见基本方案，步骤 1），吸去培养基并用胰酶消化（见基本方案，步骤 5）。进行基本方案中剩下的步骤时，纯化的储存品按照步骤 8a 使用重组痘苗病毒，病毒原液储存品则按照步骤 8b 操作；如果合适，两种也可以同时使用。

悬浮生长的细胞也可以用来产生效应细胞和靶细胞。对于这种情况，可仿照基本方案中的步骤 6。

所有细胞(转染或未转染的)都可以当作单层细胞进行感染。这种方式，可采用 MOI 为 10，小体积于 37℃感染细胞 1～2h，期间摇动数次。再加入 EMEM-2.5 以增加体积并在 31℃孵育过夜。第二天，用不含胰酶的细胞解离缓冲液将细胞分散开，按照厂商说明进行(如细胞解离缓冲液，Invitrogen)。按照前述的方法继续进行细胞融合(见基本方案，步骤 11～14)。

当用多个痘苗病毒共同感染某一细胞时，先将病毒预混合。此种情况下，总 MOI 不应超过 30。

备选方案 2　活化的可溶性 CD4 融合检测

可溶性 CD4 (soluble CD4，sCD4) 检测为两步机制提供了直接的证据，两步机制认为包膜蛋白依次与 CD4 和辅助受体相互作用从而诱导融合。通常，使用四个结构域的 sCD4(即 1～369 氨基酸)，但别的形式(如二个结构域)的 sCD4 也是可取的。

附加材料 (其他材料见基本方案)

纯化的 sCD4(NIH AIDS 研究与参照试剂方案)

1. 如前所述产生效应细胞和靶细胞 (见基本方案，步骤 1～11)，但不要包含 CD4 受体的遗传组件 (步骤 2)。
2. 效应细胞和靶细胞计数后，室温，400*g* 离心 10min。以 2×10^6 个细胞/ml 为终浓度用 EMEM-2.5 重悬。
3. 向靶细胞中加入纯化的 sCD4，sCD4 的浓度应为融合反应时所需终浓度的 2 倍。设置一个阴性对照，即融合反应中不加 sCD4。混合 100μl (含 2×10^5 个细胞) 的效应细胞和靶细胞悬液按照基本方案步骤 13 设置融合反应。

   或者，加入 2×sCD4 到效应细胞中，或者在效应细胞与靶细胞混合后加入 1× sCD4。sCD4 的终浓度可变范围很大 (如 50～1000nmol/L)。

   对于仅在 CD4 活化后才结合包膜蛋白的单克隆抗体，为了检测该抗体对融合的抑制作用，应将表达包膜蛋白的细胞与 sCD4 和抗体在室温下或 37℃预先孵育，然后再与靶细胞混合。
4. 测定细胞融合-依赖的报道基因活性 (见辅助方案 1 或 2)。

辅助方案 1　比色法测定融合-依赖的报道基因活性

附加材料 (其他材料见基本方案，带√项目见附录 1)

融合反应的细胞混合物 (见基本方案或备选方案 1 和 2)

10% (*V*/*V*) nonidet P-40 (NP-40)

√EMEM-2.5

1000U/ml β-半乳糖苷酶标准品储存液 (Boehringer Mannheim；可选)，50μl 分装，保存于－20℃

√10×CPRG

正向计时器

微量板读板仪，配备570nm滤光片

1. 终止融合反应，向每一孔中加入10μl 10%（V/V）NP-40（终浓度为0.5%）。温和地吹打使其混匀，并在室温下孵育至少20min。
2. 可选：为了确保细胞完全裂解，将反应板放在干冰上冷冻，然后在室温融解。如果需要的话，可将冷冻的样品在－20℃保存数周。
3. 将每一个细胞裂解液取50μl仔细地加到一块新的96孔测试板的孔中（避免产生气泡）并平衡至室温。将50μl含有0.5%（V/V）NP-40的EMEM-2.5加入到测试板的孔中作为空白孔。

   细胞裂解液的量可以根据需要改变，用EMEM-2.5作为稀释剂，但在一个给定的孔中，两者的总体积必须是50μl。

4. 可选：将1000U/ml β-半乳糖苷酶标准品储存液配制一系列稀释样，用EMEM-2.5/0.5%（V/V）NP-40作为稀释剂。每个稀释度取50μl加入到测试板的一个孔中作为标准孔。
5. 配制2×CPRG底物液，用4份水稀释1份10×的储存液，并平衡至室温。
6. 用多道移液器向每一孔中加入50μl 2×CPRG底物液以启动酶反应，避免产生气泡。启动正向计时器进行动力学分析。
7. 可选：去除因去污剂而产生的气泡，将板在室温下，800g离心30s。
8. 测定每一个孔中底物水解的速率，用配备有适当滤光片的微量板读板仪在570nm处测定不同时间点（数分钟至数小时，取决于β-gal的水平）的光密度值。用EMEM-2.5/0.5%（V/V）NP-40孔作为空白。

   底物水解的速率与时间及酶量呈线性，其中与酶量及β-gal的浓度至少在3个对数范围内呈线性。通常，用光吸收值线性范围内的2个点进行计算。

9. 计算样品复孔的平均值和标准差并用这些值作图。
10. 可选：用步骤4中的标准值绘制β-gal标准曲线。用该标准曲线确定样品中β-gal的含量。

辅助方案2 原位染色测定报道基因活性

材料（带√项目见附录1）

√染色缓冲液

√Xgal，40mg/ml

融合反应的细胞混合物（见基本方案或备选方案1和2）

√10×固定液

1. 将染色缓冲液平衡至37℃。用该缓冲液1∶40稀释40mg/ml Xgal以配制染色液。
2. 细胞融合结束后（通常细胞混合后2～3h），向每一孔中加入20μl 10×固定液并在4℃孵育5min。
3. 不要扰动细胞，温和地移除150μl培养基并补加150μl已经平衡的染色液（37℃）。

放回培养箱。

4. 用倒置显微镜定期检查染成蓝色的细胞（通常 1h 后就可以观察到，但是过夜孵育后染色更完全）。计数每一孔中蓝色细胞的数目。染色后，可将板保存在 4℃（可稳定至少 1 周）。

参考文献：Moss *et al.*，1998；Nussbaum *et al.*，1994；Salzwedel *et al.*，2000

撰 稿 人：Barna Dey and Edward A. Berger

［刘斌（第九章）］

第十章　自身免疫性及炎症性疾病动物模型

本章介绍了在多种动物模型中诱导器官特异性和系统性自身免疫性及炎症性疾病的实验方案。许多诱导器官特异性自身免疫性疾病的实验方案都需要给动物注射一种适当的组织特异性抗原，如小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎（experimental allergic encephalom yelitis，EAE）。EAE 是人类最常见的脑和脊髓脱髓鞘疾病——多发性硬化症（multiple sclerosis，MS）的动物模型。单元 10.1 介绍了诱导主动性及被动性 EAE（将 EAE 疾病转移给正常受者）的详细操作步骤，以及用于诱导 EAE 的中枢神经系统（CNS）抗原——髓鞘碱性蛋白（myelin basic protein，MBP）和蛋白脂蛋白（proteolipid protein，PLP）的生化纯化方法。表 10.1.1 提供了能够在许多近交系小鼠中诱导 EAE 的非常完整实用的致脑炎肽 MBP 和 PLP 的多肽序列。

类风湿关节炎（rheumatoid arthritis，RA）是人类最常见的自身免疫性疾病。尽管没有动物模型完全类似人类疾病，但是已经研制出几种不同的小鼠和大鼠实验模型，包括胶原诱导性关节炎和佐剂性关节炎，这些动物模型与人类 RA 有许多共同的特征。单元 10.2 介绍了诱导大鼠佐剂性关节炎的操作步骤。由于抗体在大鼠佐剂性关节炎的发病机制中不起作用，因此该病被认为是单纯由 T 细胞所介导的关节炎症和关节破坏。尽管有人认为本模型中 T 细胞可以识别分枝杆菌、软骨蛋白聚糖、分枝杆菌或人热激蛋白，但是致病性 T 细胞识别自身抗原的本质尚不清楚。单元 10.3 介绍了小鼠胶原诱导性关节炎的诱导和评定方法。异种胶原免疫后，动物会出现许多与人类疾病相类似的多关节炎症状。与佐剂性关节炎不同，体液免疫和细胞免疫应答在胶原诱导性关节炎的发病机制中都起到重要的作用。单元 10.4 介绍了应用小鼠甲状腺球蛋白免疫诱导实验性自身免疫性甲状腺炎的操作步骤。实验性自身免疫性甲状腺炎是研究人类自身免疫性甲状腺炎（hashimoto's thyroiditis，HT）的一个很好的动物模型。

单元 10.5 介绍了人重症肌无力的小鼠模型，重症肌无力是 T 细胞依赖的，由抗体介导的自身免疫性疾病。在介绍了小鼠模型的诱导方法以后，该单元还介绍了用于疾病诱导所需的加利福尼亚电鱼器官乙酰胆碱受体（acetylcholine receptor，AChR）的抽提和纯化方法。此外还介绍了关于抗 AChR 抗体的检测、临床疾病进展和乙酰胆碱酯酶抑制剂逆转疾病的效果的评定方法。

人类 I 型糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病（insulin-dependent diabetes mellitus，IDDM）是一种由于胰腺的胰岛 β 细胞被破坏所导致的自身免疫性疾病。单元 10.6 介绍了应用非肥胖型糖尿病（non-obese diabetic，NOD）小鼠的实验方案。NOD 小鼠在自然环境的影响下，特别是饮食及接触微生物病原菌时，能够发生 IDDM。该单元的内容还包括：维持允许 NOD 小鼠充分显示它们自身免疫潜能的实验方案，以及疾病诊断特别是定量检测胰岛炎程度的方法，还提供了一种可作为胰岛抗原的胰腺胰岛细胞的分离方法。单元 10.7 介绍了去除调节性 T 细胞后诱导大鼠糖尿病的一种方法。通过胸腺切除和放射性照射可造成动物部分 T 细胞缺陷。大鼠在正常情况下不会产生自身免疫性疾

病，通过以上的处理方法，就能诱导它们产生自发性的糖尿病。

单元 10.8 介绍了一种在严重联合免疫缺陷（severe combined immunodeficiency，SCID）小鼠中诱导炎症性肠道疾病（inflammatory bowel disease，IBD）的被动转移方法。给 SCID 小鼠转输来源于 BALB/c 小鼠的 $CD45RB^{high}$ $CD4^+$ 细胞，将会导致这些小鼠发生与人类 IBD 相似的胃肠道损伤和组织学特征的变化。单元 10.10 介绍了一种更利于人们了解 IBD 免疫发病机制的动物模型，在该模型中使用了 2，4，6-三硝基苯磺酸（2，4，6-trinitrobenzenesulfonic acid，TNBS）（给 SJL 小鼠直肠注射 TNBS 会诱发严重的直肠炎症）。通过这种方法诱导的直肠炎与人类克罗恩病（Crohn's disease）的临床表现和组织病理学改变都类似。该单元介绍了 TNBS 诱导直肠炎的方法及有关疾病监测和病情分级的方法。该单元还包括了分离肠系膜淋巴细胞和黏膜固有层单个核细胞的辅助方案。

单元 10.9 介绍了一种诱导和检测小鼠过敏性哮喘的实验方法，包括在体内（*in vivo*）研究支气管哮喘的特征性标志——气道炎症和气道超敏性的实验方法。也讨论了关于研究过敏原诱导的 T 细胞应答和 IgE 应答的实验方法，这将有利于确定与气道超敏性有关的敏感性的程度和分级。

系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosis，SLE）是一种涉及全身多个脏器的炎症性自身免疫病，这种疾病的一个主要特征是出现针对自身抗原的自身抗体，正是由这些抗体形成的部分免疫复合物导致了疾病过程中的组织损伤。单元 10.11 介绍了在不同的小鼠 SLE 模型中定量检测这些自身抗体的一系列的实验方法。

撰 稿 人：Ethan M. Shevach

单元 10.1 小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎（EAE）

实验性自身免疫性脑脊髓炎（experimental autoimmune encephalomyelitis，EAE）会导致小鼠进行性后肢瘫痪。EAE 被普遍认为是人类多发性硬化症（multiple sclerosis，MS）的动物模型，为研究 $CD4^+$ Th1 细胞介导组织损伤的发病机制及其免疫调节作用提供了一个有用的模型。

注：为在 SJL 小鼠的其他小鼠中有效的诱导 EAE，需要对操作方案做出一些修改，请阅读参考文献。

基本方案 应用 PLP 和 MBP 蛋白或多肽主动诱导 EAE

材料（带√项目见附录 1）

不完全弗氏佐剂（IFA；Difco）

结核分枝杆菌 H37Ra（灭活并烘干；Difco）

2mg/ml 神经源性抗原（表 10.1.1）：髓鞘碱性蛋白（MBP，见辅助方案 2），蛋白脂蛋白（PLP，见辅助方案 1）或相应的免疫决定簇表位多肽（如 $PLP_{139\text{-}151}$、$PLP_{178\text{-}191}$ 或 $MBP_{84\text{-}104}$）

雌性 SJL 小鼠，5～8 周龄（如 Jackson Lab 或 Harlan Lab）

百日咳毒素（List Biologicals）

碳酸品红溶液（可以选择）

13ml 聚苯乙烯试管

18G 和 25G 注射器针头（Becton Dickinson）

1ml 玻璃注射器（Leur-lok 塞）（如 VWR）

小（动物）剪刀（A2 型）

表 10.1.1　在各种近交系小鼠中 MBP、PLP 和 MOG 致脑炎肽

小鼠种类	H-2 型	肽[a]	序列[a]	参考文献
PL/J,B10.PL	$H-2^u$	MBP_{Ac1-11}	Ac-ASQKRPSQRHG	Zamvil *et al*. (1986)
		MBP_{35-47}	TGILDSIGRFFSG	Zamvil *et al*. (1988)
		PLP_{43-64}	EKLIETYFSKNYQDYEYLINVI	Whitham *et al*. (1991)
SJL	$H-2^s$	MBP_{89-101}	VHFFKNIVTPRTP	Sakai *et al*. (1988)
		MBP_{84-104}	VHFFKNIVTPRTPPPSQGKGR	Tan *et al*. (1992)
		$PLP_{139-151}$[b]	HSLGKWLGHPDKF	McRae *et al*. (1995)
				Tuohy *et al*. (1989)
		$PLP_{104-117}$	KTTICGKGLSATVT	Tuohy and Thomas(1993)
		$PLP_{178-191}$	NTWTTCQSIAFPSK	Greer *et al*. (1992)
		PLP_{57-70}	YEYLINVIHAFQYV	Greer *et al*. (1996)
		MOG_{92-106}	DEGGYTCFFRDHSYQ	Amor *et al*. (1994)
(PL/J×SJL)F1	$H-2^{s/u}$	MBP_{Ac1-11}	Ac-ASQKRPSQRHG	Zamvil *et al*. (1986)
		PLP_{43-64}	EKLIETYFSKNYQDYEYLINVI	Whitham *et al*. (1991)
		$PLP_{139-151}$[b]	HSLGKWLGHPDKF	Whitham *et al*. (1991)
C3H	$H-2^k$	$PLP_{103-116}$	YKTTICGKGLSATV	Tuohy *et al*. (1988a)
SWR	$H-2^q$	$PLP_{215-232}$	PGKVCGSNLLSICKTAEF	Endoh *et al*. (1990)

a. MBP 肽序列是基于不同种类的 MBP 变体，具有数目不等的氨基酸残基；PLP 肽序列来源于小鼠。读者可查阅参考文献以获得更多的信息。

b. $PLP_{139-151}$序列 140 位丝氨酸（S）替换为半胱氨酸（C）以增加可溶性。

1. 将 10ml IFA 与 40mg 结核分枝杆菌 H37Ra（4mg/ml）混合制备成弗氏完全佐剂（CFA）。制备神经源性抗原与 CFA 混合成的乳化剂，将 1ml 神经源性抗原（2mg/ml）与 1ml CFA 混合，然后用末端磨钝的 18G 注射器针头连接 1ml 玻璃注射器，反复抽进和推出上述混合物至 13ml 聚苯乙烯试管内（也可用超声方法制备乳化剂）。

   成功诱导 EAE 所需要的神经源性抗原和结核分枝杆菌的最低剂量，根据所选择的抗原/抗原肽的不同及 SJL 小鼠的来源和年龄的差别而变化，通常需要进行预试验来确定。作为指导量，用 50nmol（87μg）$PLP_{139-151}$ 与 CFA（含有终浓度为 2mg/ml 的结核分枝杆菌）制成乳化剂，给每只 SJL 小鼠单次免疫，足以诱导 80%～90% 的小鼠发生严重的 EAE。应用 MBP_{84-104} 主动诱导 EAE，需要 100nmol MBP_{84-104} 免疫两次，中间间隔一周。应用 MBP 或 PLP 全蛋白主动诱导 EAE，单次免疫即可成功，所需剂量 50～100μg。

2. 用 18G 注射器针头抽取乳化剂至 1ml 玻璃注射器内，注意不要有气泡，然后更换为 25G 注射器针头进行免疫。

3. 用小（动物）剪刀剪去 SJL 小鼠背部毛发。在去除毛发的区域分三处（每处约 0.033ml）皮下注射 0.1ml 乳化剂，其中一处沿两肩之间的背部中线，另外两处在下背部的中线两侧。
4. 当应用 MBP 或 $MBP_{84\text{-}104}$ 免疫时，还需要在免疫的当天及免疫后 2d 经腹腔注射（i. p.）或静脉注射（i. v.）400ng 百日咳毒素。
5. 需要时可以用碳酸品红溶液在免疫小鼠的背部或尾部做记号。每天观察小鼠临床症状的进展情况（表 10.1.2 和表 10.1.3），这些症状在免疫后 14～28d 比较明显。

有许多方法用于描述 EAE 临床资料（表 10.1.4）。评价各实验组间疾病发病率的统计学意义可用χ^2检验。依据实验设计，评价各实验组间的平均临床评分、平均起始发病时间以及平均高峰期疾病严重性的统计学意义可用 ANOVA 或 t 检验。

依据实验设计，也常常根据各种组织学标准，例如炎症细胞的浸润程度和（或）严重度及脱髓鞘程度，来检查患病小鼠的脊髓。

表 10.1.2　EAE 临床评估分级方法

评分	临床症状
0	正常小鼠；无明显的病征
1	尾无力[a] 或后肢无力[b]
2	尾无力[a] 和后肢无力[b]
3	后肢偏瘫[c]
4	后肢完全瘫痪[d]
5	濒死状态；死于 EAE；人道主义处死

a. 尾无力：尾巴完全没有力气，举起小鼠时尾巴尖部不能卷曲。

b. 后肢无力：观察到鸭步态，体征为步行时小鼠后肢从笼子罩的铁丝网漏下。

c. 后肢偏瘫：小鼠不再能用后肢维持臀部的姿势或行走，但是仍能在某种程度上移动一侧或两侧肢体。

d. 后肢完全瘫痪：后肢完全失去移动能力，小鼠仅能用前肢拖动躯体。这种状态下的小鼠仅能通过笼子底部喂食，延长的饲水吸管，以及皮下注射生理盐水以防止因脱水而死。

表 10.1.3　疾病临床阶段

疾病阶段	定义
急性期	第一次发作[a]
缓解期	临床发作后的临床改善期；在急性期达到高峰后或已达到疾病的复发期后，临床评分下降至少 2d[b]
复发期	达到缓解期后至少 2d，临床评分至少增加 1 级

a. 在 $PLP_{139\text{-}151}$ 诱导的疾病中，大多数小鼠的临床评分可达到 3 分或 4 分。

b. 尽管有的小鼠可以完全恢复，大多数小鼠保留一些神经学缺陷。

表 10.1.4　临床资料参数

临床资料	参数定义
平均临床评分	一组实验全部动物在起始发病后某一时间的平均临床评分
发病百分率	表现出急性和（或）复发性临床症状的小鼠数目除以实验组中所有动物的总数
平均起始发病或复发时间	一组表现临床症状的实验小鼠第一次出现急性和（或）复发性临床症状的平均天数
平均高峰期疾病严重性	一组表现临床症状的实验小鼠中达到平均最大临床评分

备选方案　MBP 或 PLP 特异性淋巴细胞被动转移性诱导 EAE

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

√Mishell-Dutton BSS（平衡盐溶液）
√DMEM-5 完全培养基
100 目不锈钢网（如 Fisher 公司产品）
50ml 锥底聚苯乙烯离心管
37℃，7.5%CO_2 培养箱

1. 用 MBP 或 PLP 免疫 SJL 小鼠（见基本方案 1，步骤 1～3），免疫后 7～10d，处死小鼠并取出淋巴结（腹股沟、腘窝、腋窝；附录 2H）。将这些淋巴结置于 Mishell-Dutton BSS（平衡盐溶液）中。
2. 用 3ml 注射器针芯挤压淋巴结，使之通过 100 目不锈钢网，制备成单个细胞悬液。用 Mishell-Dutton BSS（平衡盐溶液）冲洗钢网，将冲洗液加入单个细胞悬液中。
3. 用含有 50μg/ml 神经源性抗原的 DMEM-5 完全培养基调整细胞浓度为 6×10^6 个细胞/ml，制备神经源性抗原致敏的淋巴结细胞。在 37℃，7.5% CO_2 培养箱中培养 72h。

   撰稿人常规性在体外应用同源性抗原再次活化神经源性抗原致敏的淋巴结细胞（需要确定每一批次的蛋白质或合成肽合适的抗原浓度）；然而，可以用刀豆蛋白 A（Con A）来再次活化引流淋巴结细胞。Con A 活化将会减少神经源性抗原特异性细胞的丰度，因此，为了获得可靠且严重的 EAE 需要注射较大数量的细胞。所需 Con A 活化细胞的数量应该通过经验来确定。

4. 收取神经源性抗原活化的淋巴结细胞。将细胞悬液置于 50ml 锥底聚苯乙烯离心管内，300g 离心 15min。用 Mishell-Dutton BSS（平衡盐溶液）洗涤，再次离心。用 BSS 缓冲液重悬细胞，计数细胞并用台盼蓝拒染实验确定细胞的活力（附录 3C）。
5. 给正常 SJL 受鼠用 0.5ml Mishell-Dutton BSS（平衡盐溶液）i. p. 或 i. v. 1×10^7 个活性细胞，监测 EAE 的发生（见基本方案 1，步骤 5）。

   无论是淋巴细胞供鼠或受鼠都不需要注射百日咳毒素。

   EAE 的起始发病时间 i. v. 的动物比 i. p. 的动物快 1～2d。

辅助方案 1　PLP 蛋白的纯化

材料（带√项目见附录 1）

牛脑或脊髓（Pel-Freez）
√氯仿/甲醇（CM），4℃
甲醇，4℃
丙酮（Aldrich），4℃
√氯仿/甲醇/1%乙酸（CM/乙酸），4℃
乙醚（Aldrich）
2-氯化乙醇（Aldrich）

不锈钢搅拌器

Whatman 1 型滤纸（Whatman 或 Fisher）

Corex 离心瓶（Corning）

布氏漏斗（Fisher）

分液漏斗

氮气

1m×2.5cm 的亲脂性 Sephadex LH-60-120 填充柱 Teflon-fitted，均用氯仿/甲醇/1%乙酸平衡

Spectrapor 12～14kDa MWCO 透析袋（Spectrum 或 Fisher）

BCA 试剂盒（Pierce）

1. 将 100g（湿重）牛脑或脊髓与 1900ml 4℃ CM 混合，用匀浆器制成匀浆并通过布氏漏斗和 Whatman 1 型滤纸真空过滤。滤过液（全脂性抽提物，TLE）在 4℃可以储存 6～12 个月。
2. 将 200ml TLE 与 40ml 水混合，转移至 Corex 离心瓶内，1000*g* 离心 30min。弃去上层液相。用 4℃甲醇（用量可变化）溶解交界面的白色沉淀物，边滴边轻柔地混合。加入 4 倍体积 4℃预冷的丙酮，混匀，转移至分液漏斗中。4℃静置至少 1h（不要过夜）。
3. 收集漏斗底部的沉淀物至 Corex 离心瓶内，3000*g* 离心沉淀物 30min。吸去溶剂，氮气流作用 10min 以干燥沉淀物。再用 10ml 氯仿/甲醇/1%乙酸溶解沉淀物（4℃可以储存 8 周）。
4. 将 10ml PLP 沉淀物上样至已经用 500ml 氯仿/甲醇/1%乙酸平衡的亲脂性 Sephadex LH-60-120 柱（1m×2.5cm）中。加入 500ml 氯仿/甲醇/1%乙酸，让 PLP 自柱中流出。按每份 2ml 收集滤出成分至玻璃管中。检测 OD_{280}，收集并储存 OD_{280} 值≥0.5 的部分（通常有 10～15 份）。4℃可以储存 4 周。
5. 将 80ml（4 倍体积）4℃乙醚加入 20ml 收集成分中，在 4℃放置 1h 使之沉淀。3000*g* 离心 30min。弃去溶剂，在氮气流中彻底干燥沉淀物（一般需要 15min），确保沉淀物中不含有水或乙醚。将沉淀物溶于 5ml 2-氯化乙醇中，不断搅拌（≥1h）。
6. 将溶解物转移至 12～14kDa 滤过分子质量的透析袋中，用 6L 去离子水透析，中间换液 3 次（每半天换液一次）。预计透析袋内容积增加 25%。
7. 应用 BCA 检测试剂盒确定蛋白质浓度，用 12%丙烯酰胺凝胶 SDS-PAGE（单元 12.3）分析纯度。液体 PLP 在 4℃储存不要超过 1 个月。

辅助方案 2 MBP 蛋白的纯化

材料（带√项目见附录 1）

牛脑或脊髓（Pel-Freez）

√氯仿/甲醇（CM），4℃

0.01mol/L HCl（Aldrich）

√饱和硫酸铵 $(NH4)_2SO_4$

乙醚（Aldrich）
0.25mol/L NaOH
布氏漏斗（Fisher）
不锈钢搅拌器
Whatman 90 型和 4 型滤纸（Whatman 或 Fisher）
Corex 离心瓶（Corning）
12～14kDa MWCO 透析袋（Spectrum 或 Fisher）

1. 将 100g（湿重）牛脑或脊髓与 500ml 4℃ CM 混合，用匀浆器制成匀浆。加入 2.5L CM 4℃搅拌过夜。
2. 应用布氏漏斗和 Whatman 90 型滤纸真空过滤匀浆液。将滤纸上的残留物转移至匀浆器中，加入 3L CM 制成匀浆。
3. 重复真空过滤并用 1L 水重悬滤纸上的残留物。4℃搅拌混合物 1h。
4. 重复真空过滤并用 300ml 0.01mol/L HCl 重悬滤纸上的残留物。用 pH 计检测 pH，使混合物中的 pH 维持在 3.0～3.2。逐滴加入 0.01mol/L HCl 直到 pH 稳定（通常需要 1h）。
5. 用 Corex 离心瓶 47 000*g* 离心 10min。取上清并用 Whatman 4 型滤纸过滤。在上清液中边搅拌边逐滴加入等量饱和硫酸铵，4℃搅拌过夜。
6. 47 000*g* 离心 10min。弃去上清，用 50ml 0.01mol/L HCl 溶解沉淀物。转移至12～14kDa 滤过分子质量的透析袋中，用 6L 去离子水透析，透析 6h 后更换透析液。
7. 47 000*g* 离心透析袋内容物 10min。保留上清，弃沉淀。用 0.25mol/L NaOH 边搅拌边滴加，调整上清液 pH 至 7.0（初始值 4.5）。
8. 47 000*g* 离心 10min。弃去沉淀物。用标准的冷冻真空干燥器冷冻真空干燥上清液。4℃储存冷冻真空干燥品（MBP）。使用前测定蛋白质浓度。

参考文献：Miller and Karpus，1994；Miller *et al.*，1995
撰 稿 人：Stephen D. Miller and William J. Karpus

单元 10.2　大鼠佐剂性关节炎

佐剂性关节炎是一种可诱导的慢性关节炎，常用于研究人类类风湿关节炎和其他关节炎或炎症性疾病。

基本方案　佐剂性关节炎的诱导

材料

10mg/ml 热灭活结核分枝杆菌（H37Ra 型）混悬于不完全弗氏佐剂（IFA；见辅助方案）
Lewis 大鼠，6～12 周龄，无病原菌级（表 10.2.1 是各种大鼠佐剂性关节炎的发病率）
1ml 玻璃注射器

20G 和 25G 注射器针头
标尺
控制大鼠装置
湿棉球

表 10.2.1　各大鼠种类中佐剂诱导性关节炎的发病率

大鼠种类	RT1 单倍型	发病率[a]
远交系		
Sprague-Dawley(SD)	—	±60%
Wistar CFN 和 HLW	—	±40%
近交系		
Lewis(Lew)	l	90%～100%
Buffalo(Buf)	b	50%[b]
Brown Norway(BN)	n	100%[b]
Lew. 1N	nvl	66%
WF. 1N	n	100%
MAXX	n	100%
Dark Agouti(DA)	avl	100%
Wistar King Aptekman(WKA)	k	75%
Fisher(F344)	lvl	20%
Holtzman	—	100%
Wistar Furth(WF)	u	<10%

a. 体重 150～300g 大鼠的发病率。

b. Buffalo 和 Brown Norway 大鼠对 AA 易感性有所不同。雄性 Buffalo 大鼠对 AA 抵抗，此发病率指雌性大鼠发病率。而雌性 Brown Norway 大鼠对 AA 抵抗，此发病率指雄性大鼠发病率。

1. 振荡混有热灭活结核分枝杆菌的 IFA 以确保均匀分散，吸入带有 20G 注射器针头的 1ml 玻璃注射器内。
2. 称量 6～12 周龄 Lewis 大鼠的体重，检测双侧踝关节和腕关节的厚度，重复测量 3 次，取平均值作为免疫前的基础值（基线）。将大鼠放置于控制装置内或用乙醚或其他吸入剂麻醉（附录 2D）。弄湿近尾侧背部皮肤以增加毛发下皮肤的可见度。
3. 更换注射器针头为 25G。用手搓动注射器以混匀结核分枝杆菌混悬液。每一只大鼠重复免疫 2～5 处。皮内注射 0.1ml 含结核分枝杆菌的混悬液（附录 2E）。
4. 免疫后第 10～25 天，每天通过肉眼观察来评定疾病的发生发展情况。评估步行能力及踝关节和腕关节及小指（趾）间关节的皮肤红肿情况。

   应用以下的标准评定关节炎的强度：

   0＝无红斑或肿胀
   1＝轻微的红斑或一个趾的肿胀
   2＝红斑和超过一个趾的肿胀
   3＝红斑和踝部或腕部肿胀
   4＝全部红斑及脚趾和踝部或手指和腕部的肿胀，踝或腕不能弯曲

对四肢进行评分，关节炎指数最高为16。

5. 免疫后第10～25天，每天给大鼠称重以观察体重的变化。
6. 25d以后，在两周内每2～3天对每只大鼠进行评分和称重。

佐剂性关节炎发病过程的时间曲线见图10.2.1。

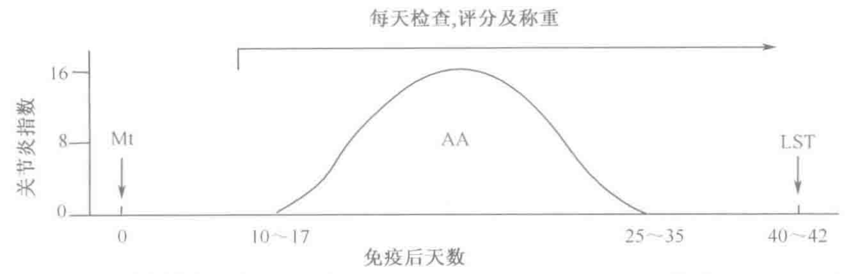


图10.2.1 佐剂性关节炎（AA）发病过程中关键事件的时间曲线。Mt：注射结核菌素；LST：淋巴细胞刺激试验，一种T细胞增殖试验。

辅助方案 分枝杆菌悬液的制备

目前尚未见适合诱导佐剂性关节炎的CFA的商业化产品。

材料

100mg干燥的、热灭活结核分枝杆菌（H37Ra）
不完全弗氏佐剂（IFA；Difco）
研杵和直径约7cm的粗糙玻璃或瓷研钵
15ml塑料或玻璃试管

注意：在操作油性分枝杆菌悬液时要戴上手套，因为会对人体造成刺激和潜在的致过敏作用。

1. 将100mg干燥的、热灭活结核分枝杆菌放入直径约7cm的粗糙玻璃研钵内，用研杵剧烈研磨≥2min，直到分枝杆菌干粉的颜色由灰色变为白色。
2. 加入3ml IFA，继续研磨≥1min，直到混合物变为糊状，将这些糊状物移入15ml的试管内。
3. 在研钵内加入3ml IFA，研磨30s重悬残余的糊状物，将这些糊状物移入15ml的试管内。
4. 在研钵内再加入4ml IFA研磨30s，将这些糊状物移入15ml的试管内，4℃储存小于1个月。
5. 在应用这些重悬液之前，仔细摇匀以确保分枝杆菌颗粒均匀分散。

参考文献：Bersani-Amado *et al.*，1990；Taurog *et al.*，1985

撰 稿 人：Willem van Eden，Josee P. A. Wagenaar-Hilbers，and Marca H. M. Wauben

单元10.3 胶原诱导性关节炎

应用II型胶原（CII）免疫易感的啮齿动物和非人灵长类动物可诱发胶原诱导性关

节炎（CIA）。免疫后这些动物出现自身免疫介导的多关节炎，在许多临床表现、组织学和免疫学方面与人类类风湿性关节炎相类似。

注意：本实验方案针对 DBA/1JLacJ 小鼠，对其他的种类则需要做出各种调整。请阅读参考文献。

基本方案　诱导小鼠胶原性关节炎

材料

鸡或牛 CII（见辅助方案 1 或从 Sigma 或 Chondrex 公司购买），α1（II）链（见辅助方案 2），或 CII 的 CB11 片段（见辅助方案 3）

10mmol/L 乙酸，0.2μm 滤膜过滤除菌

不完全弗氏佐剂（IFA；Difco）

结核分枝杆菌 H37Ra；加热灭活；可以写信给英国 Surrey，Weybridge，农业、渔业和食物部、兽医中心实验室而获得

DBA/1JLacJ 小鼠（Jackson Lab）

研钵和研杵

Virtis 高速匀浆器（Virtis；可选择）

1ml 玻璃注射器

26G 注射器针头

注意：CFA 是极强的致炎剂，特别是皮下注射或进入眼睛内，能够引起严重的皮肤腐烂或影响视力。自体注射能够引起结核菌素试验阳性并导致肉芽肿反应。在操作 CFA 时应当戴手套及眼睛防护罩。

1. 将 CII 溶于 10mmol/L 乙酸中，4℃振摇过夜（直到注射前都要保持冷藏以防变性）。注射 50μl（含有 100μg CII），配制 CII 的浓度为 4mg/ml；注射 100μl，配制 CII 的浓度为 2mg/ml。使用相同剂量的 CII 或 CII 片段。
2. 制备 CFA：用研杵在研钵内研磨加热灭活的结核分枝杆菌和 IFA 混合物，结核分枝杆菌的终浓度为 4mg/ml。
3. 使用高速匀浆器或单元 1.2 描述的乳化技术，在免疫前将 CII 和等体积的 CFA 制成乳化剂。在整个制备过程中应当保持胶原的冷藏状态。
4. 使用带有 26G 注射器针头的 1ml 玻璃注射器在小鼠的尾部皮内注射 CII/CFA 乳化剂（附录 2E）。

   通常情况下，注射 50μl 体积内含有 100μg 结核分枝杆菌和 100μg CII；然而，最少应用 10μg CII 即可诱导出关节炎。初次免疫 2～3 周后，用 50μg CII 和 IFA 的乳化剂再次激发，只有在使用 α1（II）链或 CB11 片段来诱导关节炎时才需要这样做。

5. 评定关节炎的进展情况（辅助方案 4）并且检测 T 细胞对 CII 应答情况（见辅助方案 5）。

   对于 DBA/1JLacJ 小鼠，应用 CII 免疫，典型的关节炎表现出现于免疫后 3～5 周，疾病的高峰期在第 6 周出现。关节炎是单相病程，其最终转归或者表现为正常的肢体，或者更为常见的是出现一只严重关节强直的爪。前爪或后爪或前后爪都可发

生关节炎，疾病高峰期会累及从踝到脚趾的整个爪。尽管关节炎早期症状难以检测，但是在疾病完全发作时，即使是未经训练的观察者都可以容易地辨别该疾病。

辅助方案 1　II 型胶原（CII）的纯化

本方案介绍了从鸡和胎牛软骨纯化 CII 的方法。应用本方案也可从其他种类动物（如大鼠、小鼠或猪）的软骨中纯化出 CII。不论其来源如何，在抽提 CII 之前都必须去除 I 型胶原。

材料（带√项目见附录 1）

胎牛关节或鸡胸骨
70% V/V 异丙醇
√Tris-盐酸胍溶液
10mmol/L，100mmol/L，500mmol/L 乙酸
70% V/V 甲酸
胃蛋白酶（3×结晶品；Sigma）
5mol/L NaCl
10mmol/L Na_2HPO_4
TBS：500mmol/L Tris-Cl，pH7.4（附录 1）/200mmol/L NaCl
DE-52 离子交换树脂（Whatman）
手术刀或单边刀片
食物加工机或带有锋利刀片的搅拌机
Sorvall RC-5B 或 250ml 离心管及 1L 离心瓶
透析袋（MWCO 10 000）
5cm×20cm 层析柱

注意：操作胎牛和鸡组织时应当采取特殊预防措施。胎牛组织是一个感染流产杆菌潜在的来源，鸡组织也可能感染了沙门氏菌或弯曲杆菌。应当戴上手套、面罩及眼罩，解剖组织前应当用 70%异丙醇彻底漂洗组织。残留组织应作为潜在的生物毒性物质而进行相应地处理（见前言）。

注：除特殊说明外本流程所有的步骤都需在 4℃以下操作。

1. 解剖组织前用 70%异丙醇彻底漂洗组织。用手术刀或单边刀片仔细解剖牛关节的关节软骨，小心地把软骨与骨和其他非软骨组织分离开。留意不要带含有 I 型胶原的纤维软骨。

   软骨是牢固的有弹性的半透明组织。非软骨组织是强韧的白色有弹性的难以切割的组织。

   当使用鸡胸骨时，用含有 1mol/L NaCl 的 50mmol/L Tris-Cl 4℃孵育过夜则比较容易去除软骨膜（富含 I 型胶原）。去除软骨膜，然后用手将软骨从胸骨上分离下来。

2. 用手术刀将软骨切成约 5mm 大小的碎片。用食物加工机或带有锋利刀片的搅拌机，将软骨碎片尽可能地绞碎。为了易于操作，可以用适量的蒸馏水和碎冰块覆盖软骨

碎片并使其温度低于 4℃。

3. 使用 1L 离心瓶，≤4℃，4600*g* 离心 45～60min 去除水分，应用 Sorvall RC-5B 或相当的转子。加入 10ml Tris-盐酸胍溶液/g 软骨碎片，≤4℃搅拌过夜。
4. 使用 1L 离心瓶，≤4℃，4600*g* 离心 30min，弃去上清，收集软骨碎片。用预冷的蒸馏水洗涤 3 次以除去盐酸胍，每次加入 10～15ml 预冷的蒸馏水/g 软骨碎片，离心，弃去上清液。
5. 用 20 倍体积 500mmol/L 乙酸重悬软骨碎片，用 70%甲酸调节 pH 至 2.8。加入胃蛋白酶，按 1g 胃蛋白酶/20g 软骨（湿重），在冷室内温和地搅拌 36～48h。
6. 使用 1L 离心瓶，≤4℃，5000*g* 离心 30min，分离可溶性的 CII。弃去碎片。如果由于黏度太高而使分离效果较差，可以添加 500mmol/L 乙酸稀释后再重复离心。
7. 在上清液中缓慢（超过 30～45min）加入 5mol/L NaCl，使其终浓度为 0.8mol/L。使胶原 4℃沉淀 12～24h。
8. 使用 1L 离心瓶，≤4℃，4600*g* 离心 60min，回收胶原。弃去上清。在沉淀中加入 400ml 100mmol/L 乙酸，4℃搅拌过夜溶解沉淀。如果溶液过于黏稠，在下一次离心前添加 100mmol/L 乙酸。
9. 用 250ml 离心瓶，5000*g* 离心胶原溶液 1h，以去除所有可溶性物质。
10. 重复盐析（步骤 7～9）3 次，用 400ml 100mmol/L 乙酸溶解最终的胶原沉淀物。

    乙酸的体积取决于起始所用软骨的数量，本方案中假定为 200g。

11. 使用滤过 MWCO 10 000 透析袋，4℃，更换 10mmol/L Na_2HPO_4，以沉淀胶原。使用 250ml 离心管，4℃，9000*g* 离心 40min，弃去上清液，收集胶原沉淀。用 200ml 10mmol/L Na_2HPO_4 洗涤沉淀物 2 次，再次离心，弃去上清液。
12. 加入 400ml TBS 溶解胶原沉淀，然后用滤过分子质量为 10 000 透析袋，4℃，TBS 透析过夜。将透析过的液体通过预先用 TBS 平衡过的 5cm×20cm DE-52 离子交换树脂（见单元 1.5；用 TBS 替代 Tris-Cl）。
13. 在柱流出液中缓慢（超过 30～45min）加入 5mol/L NaCl，使其终浓度为 2.5mol/L，沉淀胶原。让胶原在 4℃沉淀 12～24h。
14. 用 250ml 离心瓶，4℃，4000*g* 离心 60min，弃去上清，收集胶原沉淀。在沉淀物加入 400ml 100mmol/L 乙酸，搅拌。然后用 MWCO 10 000 透析袋，4℃，100mmol/L 乙酸透析以去除盐分。
15. 冻干脱盐 CII，－20℃保存（处理合适可以稳定≥3 年）。使用 5%凝胶通过 SDS-PAGE 确定纯度（单元 12.3）。

辅助方案 2　胶原（II）α1 链的纯化

材料

冻干 II 型胶原（CII；见辅助方案 1）

0.06mol/L 和 0.5mol/L 乙酸钠，pH4.8，0.2μm 滤膜过滤除菌

0.06mol/L 乙酸钠，pH4.8/0.1mol/L NaCl，过滤除菌

透析袋（MWCO 10 000）或用 0.1mol/L 乙酸平衡过的 Sephadex G-10 树脂

(Pharmacia Biotech) 5cm×10cm 层析柱

45℃水槽

填充 CM-52 树脂(Whatman)且用 0.06mol/L 乙酸钠,pH4.8,平衡的 2.5cm×15cm 色谱柱

层析仪器:

通过循环泵连接温度控制水槽的水管

梯度混合器

组分收集器

分光光度计

注意:使用前缓冲液应保持无菌。细菌产生的酶可消化 CIIα1 链。

1. 用 100ml 预冷的 0.06mol/L 乙酸钠缓冲液,pH4.8,溶解 200~250mg 冻干 II 型胶原,搅拌 24~48h。45℃加热 20min 使溶解的胶原变性。
2. 将变性胶原加入预先用 0.06mol/L 乙酸钠,pH4.8,平衡过的 2.5cm×15cm CM-52 树脂柱中,用套管套住,使温度保持在 42℃。
3. 加入随线性梯度增加的 NaCl,即由 400ml 0.06mol/L 乙酸钠(pH4.8)和 400ml 0.06mol/L 乙酸钠/0.1mol/L NaCl(pH4.8)组成的梯度混合液,以 150ml/h 的流量洗脱 α1 链。监测柱上洗脱物 230nm 的吸光度并用组分收集器收集,按每 10ml 一份收集。集中这些含有 α1 链组分(230nm 最高吸光度)。
4. 加入 MWCO 10 000 透析袋,用 100 倍水(四次换液)透析或用经过 0.1mol/L 乙酸平衡的 Sephadex G-10 树脂柱(5cm×80cm)脱盐,通过分子筛方法去除洗脱物中的盐分。
5. 冻干脱盐 α_1(II)链,-20℃可以储存几年。

辅助方案 3　胶原(II)α1 链内溴化氰裂解片段的纯化

牛胶原(CII)α1 链受到 CNBr 剪切后产生肽类混合物(表 10.3.1),其中的一些肽段可用于诱导小鼠 CIA。对于 $H\text{-}2^q$ 小鼠(DAB/1LacJ),CB11 肽含有 T 细胞和 B 细胞的抗原决定簇表位,足以诱导关节炎。对于 $H\text{-}2^r$ 小鼠,CB10 肽含有 T 细胞的抗原决定簇表位及最有效的致耐受决定簇,而 CB8 肽则含有致关节炎的 T 细胞和 B 细胞表位。

表 10.3.1　溴化氰(CNBr)裂解产生的 II 型胶原片段

CNBr 片段	残基数目	在 CII 中的位置
CB1	2	非螺旋区
CB4	13	非螺旋区
CB2	3	1~3
CB3	3	4~6
CB6	33	7~39
CB12	84	40~123
CB11	279	124~402
CB8	149	403~551

续表

CNBr 片段	残基数目	在 CII 中的位置
CB10	346	552～897
CB5	10	898～907
CB9	73	908～980
CB7	38	981～1018
CB(9+7)[a]	111	908～1018

a. 鸡 CII 含有一个额外甲硫氨酸，受到 CNBr 剪切后能够产生 CB9 和 CB7 片段。而人、牛和小鼠 CII，缺乏甲硫氨酸残基，只能得到一个连续性肽 CB（9+7）。

材料

纯化的胶原（II）α1 链（见辅助方案 2）

70%（V/V）甲酸

溴化氰（CNBr）

0.02mol/L 枸橼酸钠/0.02mol/L NaCl，pH3.6（0.2μm 滤膜过滤除菌并预热至 42℃）

0.02mol/L 枸橼酸/0.15mol/L NaCl，pH3.6（过滤除菌）

Bio-Gel A-1.5m 琼脂糖凝胶（200～400 目，Bio-Rad）

带双相阀门的圆底烧瓶和 N_2

以 CM-52 树脂（Whatman）填充 2.5cm×20cm 层析柱，并用 0.02mol/L 枸橼酸钠/0.02mol/L NaCl，pH3.60 液平衡

层析仪器：

通过循环泵连接温度控制水槽的水管

梯度混合器

组分收集器

分光光度计

2cm×110cm 层析柱

注：保持层析缓冲液无菌以防蛋白水解酶降解 CB3 片段。

1. 在化学通风橱内操作，在带双相阀门连接 N_2 的圆底烧瓶内，用 100ml 70%甲酸溶解 200～250mg 纯化的胶原（II）α1 链。在烧瓶内剧烈通入 N_2 5min。加入超过 100 倍摩尔量的 CNBr 继续通入 N_2 1min，然后密封烧瓶。
2. 将烧瓶转移至 37℃水浴中孵育反应混合物 4h，确保容器密封。孵育的最后，用冷蒸馏水将反应混合物作 10 倍稀释并冻干以除去甲酸和 CNBr。－20℃储存冻干品。

   注意：冷冻真空干燥器必须能够达到至少－80℃，否则真空泵将会严重受损。
3. 将 200～250mg 冻干 CNBr 裂解的肽混合物溶于 25ml 0.02mol/L 枸橼酸/25ml 0.02mol/L NaCl，pH3.6，42℃搅拌 20min。将 CNBr 处理肽加入已经充分混匀的 0.02mol/L 枸橼酸钠/0.02mol/L NaCl，pH3.6，平衡的 2.5cm×20cm CM-52 层析柱中，将出口塞住使温度保持在 42℃。
4. 加入随线性梯度增加的 NaCl，即由 1000ml 0.02mol/L 枸橼酸/0.02mol/L NaCl 和

1000ml 0.02mol/L 枸橼酸/0.15mol/L NaCl 在梯度混合器中组成的梯度混合液，以150ml/h 的流量洗脱肽类物质。检测柱洗脱物 230nm 的吸光度并用组分收集器收集每 10ml 一份的组分。集中含有所需肽的各组分（图 10.3.1），然后按照辅助方案 2 中步骤 4 所述脱盐并冻干。

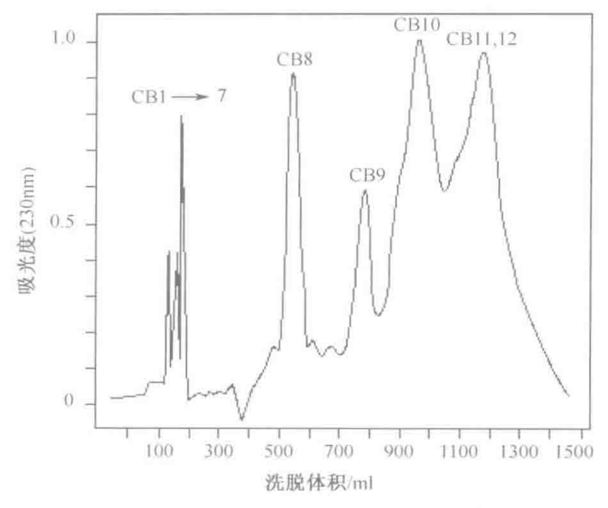


图 10.3.1　离子交换层析法纯化鸡 CII 溴化氰片段。

5. 为了从 CB12 纯化出 CB11，应用 A-1.5m 琼脂糖凝胶（200～400 目）及 2cm×110cm 层析柱对合适的组分进行分子筛层析（图 10.3.2）。必要时可以通过 A-1.5m 琼脂糖凝胶进行层析以进一步纯化 CB8 和 CB10。

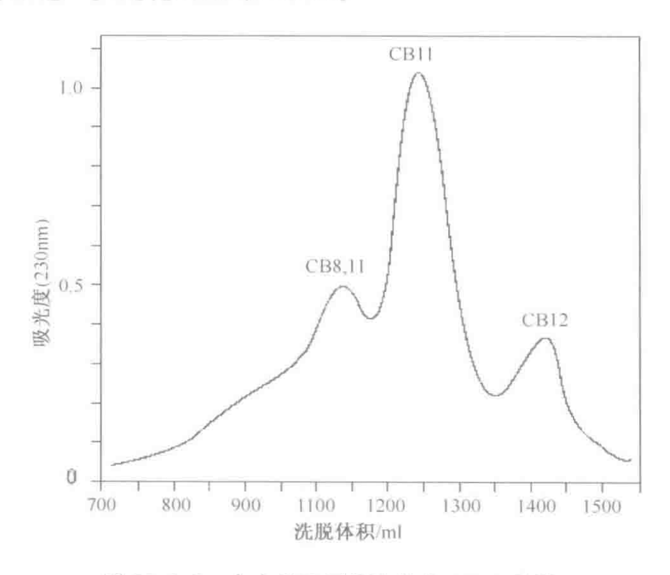


图 10.3.2　大小排出层析法纯化 CB11 片段。

6. 脱盐部分见辅助方案 2 中的步骤 4。冻干并－20℃储存（可稳定数年）。通过使用 10%凝胶进行 SDS-PAGE 电泳以确定各种 CB 肽的纯度（单元 12.3）。

辅助方案4 小鼠关节炎的评定

在啮齿动物CIA模型中，动物的四个爪子都可被累及。在疾病的高峰期，炎症可以从踝部扩展至趾端，其典型特征是极度的肿胀和充血。一旦出现关节炎，每周应当检查爪子2～3次。经常可以看到一个肢体当天还是正常的，第二天则出现明显的肿胀。尽管关节炎的病程是单相的，但严重的关节炎也可导致关节强直。

表示关节炎特征最常用的方法是一种简单的可视性0～4分的评分系统（表10.3.2），其中1分表示较轻微的炎症，而4分则代表整个爪子出现广泛肿胀和充血。图10.3.3显示了小鼠模型中不同程度炎症的例子。尽管偶尔可以观察到单个足趾肿胀，但并不认为是出现了关节炎（0分）。缺乏经验的观察者会发现炎症的阶段3和阶段4较难区分，特别是前爪，并且希望将该评分系统修改为1～3三个阶段。主观评定肿胀最大的缺点是需要考虑到关节滑膜炎的消退。偶尔肉眼可看到累及关节的减少，但是在相同的解剖区域充血和肿胀仍然存在，因此评分仍然未改变。为了有助于减少评定的主观性并避免偏见，需要两个独立的观察者来进行检查，其中有一人并不知道处理组的存在。

关节炎严重度视觉观察

将小鼠置于易于检查爪子的体位。从踝部至趾端仔细检查每一个爪子并按照表10.3.2给出从0～4分的病理评分。每周重复2～3次。避免对动物的过度处理，因为这将降低疾病的严重度和关节炎的发病率。

表10.3.2 CIA啮齿动物模型关节炎严重度视觉评分系统

严重度评分	视觉病理
0	无红斑和肿胀的证据
1	红斑和轻度肿胀局限于足中段(跗骨)或踝关节
2	红斑和轻度肿胀从踝关节蔓延至足中段
3	红斑和中度肿胀从踝关节蔓延至跖关节
4	红斑和重度肿胀包括了踝,足和趾

通过汞（Hg）置换测压法确定关节炎严重度

材料

Hg
100ml玻璃烧杯
天平

1. 将装有100ml Hg烧杯置于天平上，调节毛重至零。
2. 为便于操作，可以轻度麻醉动物（附录2D）。将动物的肢体浸入Hg中达到与毛发平齐，以克为单位记录重量的变化，重复测量4次。
3. 计算4次结果的平均值并除以13.6，把置换的重量（g）转换为体积（ml）。

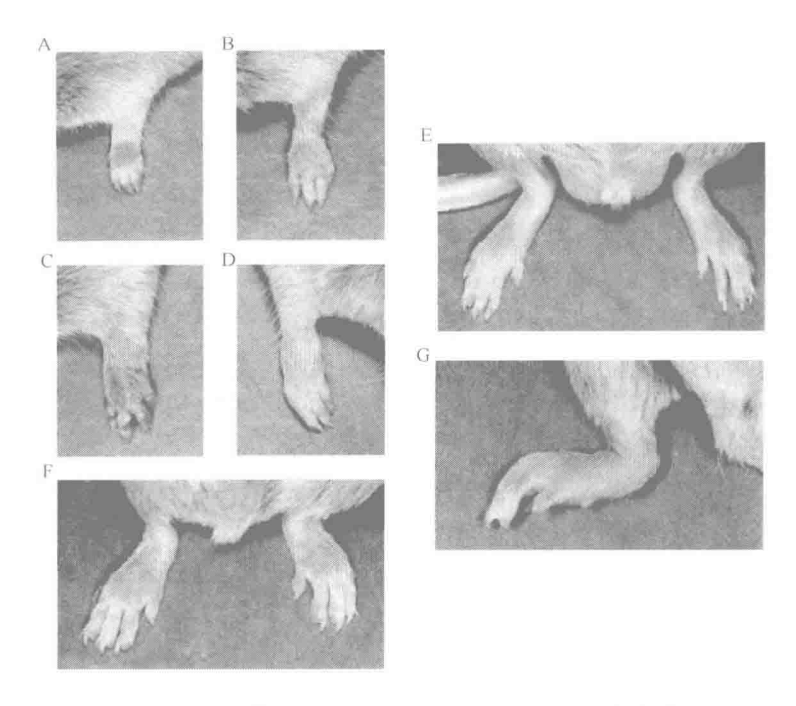


图 10.3.3　小鼠 DAB/1 CIA 模型炎症各种程度的例子。A. 正常前爪；B. 2 级炎症前爪；C. 3 级炎症前爪；D. 4 级炎症前爪已经消退并出现了关节强直；E. 正常后爪；F. 两后爪 2 级炎症；G. 4 级炎症后爪。

用测径器检测爪肿胀程度确定关节炎严重度

材料

恒压测径器

1. 将小鼠置于易检查爪子的体位，在踝部（内侧或外侧）放置恒压测径器并测量厚度最小值，为精确起见应测量 2 次。
2. 重复上述操作测量同一只爪子跗骨的踝部（腹侧或背侧）。
3. 重复测量每一只爪子。

辅助方案 5　检测 CIA 小鼠 T 细胞对 CII 的增殖应答

材料（带√项目见附录 1）

CII 致敏小鼠（见基本方案 1）
√ACK 裂解缓冲液（制备脾细胞用）
√完全 Click 培养基（不含 FBS）
抗原：天然 CII（见辅助方案 1），α1（II）（见辅助方案 2），或 CII 的 CNBr 片段（见辅助方案 3）
正常小鼠血清

^3H TdR

96 孔平底微量滴定板

0.2μm 注射器式滤器

半自动微孔板细胞收集器和玻璃微纤维膜（如 Cambridge Technology）

注意：接触细胞的所有液体和器材必须无菌，因此需要相应的无菌技术。所有的培养需在 37℃，5% CO_2 培养箱内进行。

1. 处死 CII 致敏 10d 后的小鼠并制备引流淋巴结或脾细胞的单个细胞悬液（单元 2.1）。如果使用脾细胞，需要用 ACK 裂解缓冲液溶解红细胞（单元 2.1）。
2. 4℃，750*g* 离心 10min，弃去培养基。用 Click 培养基洗涤细胞 3 次，再次离心，弃去培养基。最后，计数有活力的细胞（附录 3C），用无血清 Click 培养基重悬细胞，浓度为 5×10^6 个细胞/ml。
3. 于 96 孔培养板中加入 100μl 细胞悬液（5×10^5 个细胞）。准备足够的细胞以设立各个试验点及对照孔，至少 3 复孔。
4. 用无血清 Click 培养基系列稀释抗原（从 100μg/孔至 10μg/孔），每孔加入 100μl。0.2μm 注射器式滤器过滤除菌，然后将各稀释液按 100μl /孔加入各 3 复孔内。对照孔中加入 100 μl 培养基。
5. 每孔中加入含 1.5%正常小鼠血清的 Click 培养基。孵育 72h，然后于每孔中加入 0.5μCi ^3H TdR，放回培养箱中继续孵育 18h。
6. 应用自动细胞收集器收集细胞至玻璃微纤维膜上并通过液闪仪检测 ^3H TdR 的掺入量。

参考文献：Myers *et al.*，1989

撰 稿 人：Edward F. Rosloniec，Michael Cremer，Andrew Kang，and Linda K. Myers

单元 10.4　小鼠实验性自身免疫性甲状腺炎

小鼠实验性自身免疫性甲状腺炎（EAT）是桥本甲状腺炎很好的动物模型。

基本方案 1　实验性自身免疫性甲状腺炎的诱导和评定

材料（带√项目见附录 1）

SPF 级易感雌性小鼠（表 10.4.1），8～12 周龄

√酸化高氯水

400μg/ml 小鼠甲状腺球蛋白（MTg；见辅助方案）用无菌生理盐水稀释；－20℃可以保存 2～3 周。

200μg/ml LPS：三氯乙酸析出的沙门氏菌内毒素溶于生理盐水（Difco 或 Sigma）；分成 2ml 包装储存于－20℃；溶解后振摇使分散均匀。

福尔马林固定液：10%（V/V）福尔马林溶于 0.15mol/L 乙酸钠

1ml 注射器带有 26G 针头

组织标本盒
虹膜剪
小镊子

表 10.4.1 制备 EAT 常用小鼠

易感种类		抵抗种类	
H-2[k]	CBA/J[a]	H-2[b]	C57BL/10,C57BL/6
	C57BR		B10
	B10. K,B10. BR	H-2[d]	BALB/c
H-2[s]	SJL		B10. D2
	B10. S	H-2[f]	B10. M
H-2[q]	B10. Q[b]		

a. 最常用种类。
b. 中等敏感。
k，s，q，d. 分别代表小鼠不同的遗传基因型。

1. 取 SPF 级易感雌性小鼠，8～12 周龄，放在顶端有纸质滤膜的笼中以减少交叉感染的机会。让小鼠饮用酸化高氯水。使用小鼠前等待 1 周以上。收集免疫前正常小鼠血清（附录 2F）作为 ELISA 对照血清或用于组织培养，100μl 分装储存于－20℃。
2. 分别于 0d 和 7d，使用带有 26G 针头的 1ml 注射器经尾静脉注射 400μg/ml MTg 0.1ml，3h 后注射 200μg/ml LPS 0.1ml。未免疫小鼠或仅注射佐剂小鼠作为对照。

   对大多数种类的小鼠来说，20μg MTg 足以诱发甲状腺炎，而 40μg MTg 则能够诱导明显的甲状腺炎；10μg LPS 毒性较低且足以诱导 SJL 和 A. SW 小鼠发病。本方案所使用的剂量能够诱发中等程度的炎症浸润，这样便于观察到抑制和治疗性的效果。
3. 备选：于免疫后第 14 天和处死前收集 0.5ml 免疫血清以用于检测抗体应答情况。－20℃保存。
4. 第 28 天断颈处死小鼠（附录 2G）。暴露喉部和气管并剥去后颈部的肌肉（图 10.4.1）。为减少对易碎的甲状腺的损害，用小剪刀在喉部的上方和气管中部剪切并取出连在一起的甲状腺小叶。将甲状腺-喉-气管放入组织标本盒内并用铅笔在标本盒上标记样本数目。将标本盒浸入 10%（*V/V*）福尔马林中固定 24h。
5. 转移标本盒至组织学试验室用石蜡包埋并进行苏木精-伊红（HE）染色。调整喉-支气管方向使之垂直于切片机的刀片，行 4μm 厚度包括甲状腺小叶的连续垂直切片。收集 30～60 个组织切片，为步骤 7～10 各保留 4～5 张连续的组织切片。
6. 在低倍镜（40×）下找到损伤部位。在高倍镜（100×～250×）下确定单个核细胞浸润及甲状腺滤泡的受破坏程度。在 400×高倍镜下证实组织切片中的炎症细胞为单个核细胞（主要是 T 细胞和巨噬细胞），应当注意与邻近的淋巴结或甲状旁腺组织区分开来。

   甲状腺炎症程度用病理指数或甲状腺受累的百分率来表示。甲状腺腺体内单个核细胞浸润是诱导 EAT 成功及区别于 EAT 抵抗小鼠的标志。因为未免疫小鼠的甲

状腺中无炎症细胞浸润，因此作为一个规律，任何可辨认的甲状腺受累，通常是血管周围性浸润，都被看作阳性结果。

7. 应用标准间接 ELISA（单元 1.1）检测血清样品中 MTg 自身抗体的水平。用 1μg/孔 MTg 包被板。以 1∶200，1∶800 和 1∶6400 稀释待测血清。用正常小鼠血清作为阴性对照，用 1∶800 和 1∶6400 稀释的阳性免疫血清作为阳性对照。

   EAT 易感小鼠和 EAT 抵抗小鼠都可以产生自身抗体。出现自身抗体并不能预示甲状腺炎，但确实可以反映自身免疫应答。

辅助方案　小鼠甲状腺球蛋白的制备

使用一次性塑料制品和无 LPS 试剂来避免 LPS 污染。

材料（带√项目见附录 1）

300～500 只小鼠，任意种类，2～8 个月大小
Sephadex G-200
√PBS，pH7.2，4℃
5ml 塑料管
2.5cm×90cm 柱，分级收集器，500ml 缓冲液容器，玻璃收集管，4℃
小直镊子
5 号 90°弯镊子（Roboz Surgical Instruments）
35mm 塑料培养皿
15ml 玻璃组织匀浆器，4℃
超速离心机 SW50.1 转子和 5ml 超速离心管

1. 颈脱位法处死 10 只或更多只小鼠（附录 2G），并取出附着于喉和气管的甲状腺（图 10.4.1）。立即将甲状腺-喉-气管放入 5ml 塑料管（浸入碎冰池内）中，每管约放置 100 个标本。盖紧试管，－70℃冻存。重复上述操作直到收集 300～500 只小鼠标本（将会得到 30～60mg 纯化的 MTg）。
2. 准备 1L PBS（含有 15g Sephadex G-200），填充 2.5cm×90cm 层析柱。4℃，PBS 冲洗过夜，备用。
3. 于 4℃、融化管中的甲状腺置于冰上。用小直镊子夹住标本的喉部，去除背部残留的肌肉层。用 5 号 90°弯镊子取出两侧甲状腺小叶，放入含有 1～2ml 冷 PBS 的培养皿内，置于冰上。
4. 在预冷的 15ml 匀浆器中轻柔而快速匀浆所有甲状腺，必要时加入冷 PBS，但总量不要超过 5ml。将匀浆转移至 5ml 超速离心管内，4℃，100 000g（35 000r/min SW50.1 转子）超速离心 1h。转移上清液（粗提物）并丢弃混有膜碎片和蛋白质聚集物的沉淀。
5. 将粗提物小心地加至 Sephadex 柱。柱上连接 500ml 缓冲液容器，4℃，用 PBS 洗脱过夜。用玻璃管收集 2～3ml 成分。
6. 检测 280nm 吸光光度值（A_{280}）。集中 $A_{280}>1.0$ 的组分（10～15 管，据所用甲状腺数量的不同而异）。重新检测 A_{280} 以得到精确的浓度（$A_{280}=1$ 表示大约 1mg/ml 蛋白

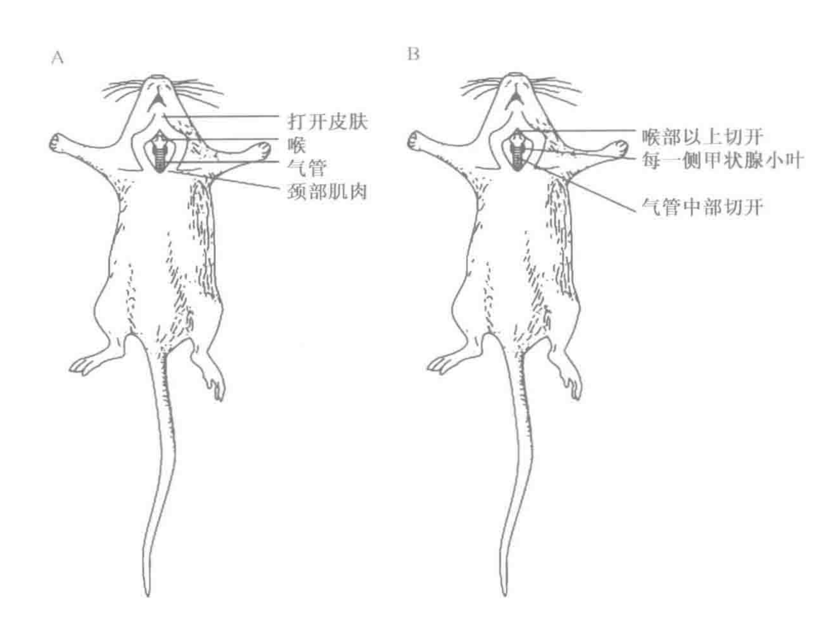


图 10.4.1　取出附着于喉和气管上部的甲状腺小叶用于组织学检查或制备抗原。A. 脱颈后，经颈部皮肤作垂直切口。分离颈部肌肉以暴露喉和气管。B. 切开气管上面的筋膜并轻轻地向上掀起，用止血钳提起气管，用闭合的弯虹膜剪，轻轻分离气管下面的软组织和食管。用弯剪刀在喉上面和止血钳下面的气管中部剪切，取出喉和气管上部及附着的甲状腺小叶。

质）。用 pH7.2 的 PBS 分装成 2ml/管（≤2mg/ml）。－20℃储存两年或更长时间，不要反复冻融。

基本方案 2　诱导 EAT 耐受

通常情况下，易感小鼠对无佐剂的 MTg 免疫不发生反应。然而，如果用非聚集性的 MTg（dMTg）免疫小鼠两次，间隔 7d，小鼠会对 EAT 产生耐受。给予第二次处理的 3d 内即可诱导耐受，耐受可以持续＞73d。这种致耐受作用是由 $CD4^+$ T 细胞介导的。因此，本方案可用于研究调节性 T 细胞在自身免疫病中的作用机制，输入甲状腺激素可以刺激内源性 MTg 的释放，也可以导致 $CD4^+$ T 细胞介导的耐受。

材料

雌性小鼠，6～7 周龄
1.5～2mg/ml MTg 溶于 PBS（见辅助方案）
PBS，pH7.2（附录 1），或无菌生理盐水（McGaw）
0.8ml 超速离心管（5mm×41mm）及 5ml 转子适配器
超速离心机 SW50.1 转子
小镊子
1ml 注射器 26G 针头

1. 在免疫诱导 EAT（0d）前 10d，将新鲜融化的 MTg 1.5～2mg/ml 装入 0.8ml 超速离心管内，准备足够提供 100μg/只小鼠的非聚集性 MTg（dMTg）。

2. 放入离心管前在转子适配器底部滴加一滴水（易于取出离心管）。4℃，100 000*g*（35 000r/min SW50.1 转子）超速离心 1h。用小镊子从适配器中取出离心管。使用巴斯德滴管小心地收集大多数上清液，丢弃底部很小的白色沉淀物。
3. 检测 280nm 吸光度（$1A_{280}$大约 1mg/ml 蛋白质）。必要时可用 PBS，pH7.2 或无菌生理盐水稀释至 1mg/ml。

   为了诱导耐受，非聚集性 MTg 在注射前可以保持在 4℃ 1～2d，4℃储存 1～2d 但未冷冻的柱流出 MTg（见辅助方案）也可不离心而直接使用。
4. 使用带有 26G 针头的 1ml 注射器，给予每只进行耐受诱导的雌性小鼠 i. v. 100μg dMTg。对照小鼠注射 PBS 或无菌生理盐水，或不注射。7d 后，准备新鲜的 dMTg 并给予每只小鼠注射 100μg。
5. 在免疫的当天和第 7 天，给对照小鼠和 MTg 耐受小鼠注射 MTg 及 LPS 诱导 EAT（见基本方案 1）。第 28 天，评定甲状腺病理学改变（见基本方案 1，步骤 4～6）。

参考文献：Kong *et al.*，1995，1996

撰 稿 人：Yi-chi M. Kong

单元 10.5　小鼠实验性自身免疫性重症肌无力

重症肌无力（myasthenia gravis，MG）是一种 T 细胞依赖性抗体介导的自身免疫性神经肌肉性疾病。抗乙酰胆碱受体（AChR）抗体破坏 AChR，因而导致神经肌肉信号传递障碍和肌肉无力。通过肌肉无力的临床评定及乙酰胆碱酯酶抑制剂逆转疾病，最常用于实验性自身免疫性重症肌无力（EAMG）的诊断。

基本方案　EAMG 的诱导和评定

材料（带√项目见附录 1）

200μg 纯化加利福尼亚鱼雷鱼的 AChR（见辅助方案 1）
√PBS
完全弗氏佐剂（CFA，Difco）
50mg/ml 戊巴比妥钠（Nembutal；Abbott Lab）
H_2O，无菌
10 只 8～10 周龄 C57BL6/J 小鼠（雄性或雌性），标记
300μl/ml 溴新斯的明，PBS 配制
120μg/ml 硫酸阿托品，PBS 配制
无菌试管
1ml 和 2ml Luer-Lok 玻璃注射器（Becton Dickinson Labware）
微乳剂针头连接器（Popper and Sons）
1ml 斜尖塑料注射器（Becton Dickinson Labware）
保温垫

25G 针头（Becton Dickinson Labware）

5cm×5cm 纱布海绵

1. 在无菌试管内用 1ml PBS 稀释 200μg 纯化加利福尼亚鱼雷鱼的 AChR，吸入 2ml 玻璃注射器并将注射器与微乳剂针头连接器的一端连接，排出空气。
2. 剧烈混合 CFA 并吸取 1ml CFA 至第二个 2ml 玻璃注射器内，排出空气并将其与微乳剂针头连接器的另一端相连，确保所有的连接都非常紧密。
3. 首先，快速地将 AChR 溶剂通过金属连接器推进装有 CFA 的注射器中，然后将这些溶剂在两个注射器间反复推抽约 5min，或直到乳化剂变得稠密而且将注射器保持直立状态时乳化剂中的小气泡不再移动。用铝箔包绕注射器和连接器并置于 4℃ 冷却 30min 使之变得更加稠密。
4. 用无菌水以 1∶10 比例稀释 50mg/ml 戊巴比妥钠。用 1ml 玻璃注射器通过 i. p. 65mg/kg 戊巴比妥钠麻醉 10 只 8～10 周龄小鼠（附录 2D）。当动物麻醉后，把它们放置在保温垫上以防止低体温。
5. 转移 AChR 乳化剂至 1ml 玻璃注射器内并连上 25G 针头，用酒精棉球消毒注射部位。分 4 个注射部位，每个部位皮下注射 50μl 乳化剂（200μl/只小鼠，含 20μg AChR）。初次免疫时于双足底和双肩部注射。
6. 将免疫后小鼠放回笼中并观察它们直至麻醉苏醒。通过爪抓紧（paw-grip）试验监测肌无力症状。

   初次免疫后 20～30d 少量（约 10%）小鼠会出现肌无力症状。
7. 30d 以后，再次免疫小鼠（重复步骤 1～5），这一次是在肩部（邻近以前免疫部位）和大腿部注射。
8. 每天监测 EAMG 的症状（见下面所述）并每周一次从尾静脉采集血样（附录 2F）来检测抗 AChR 抗体（见辅助方案 4）。

   在第二次免疫后 3～15d 之间多数（30%～60%）小鼠会出现肌无力症状。

   如果再次免疫后出现肌无力症状的小鼠很少，给小鼠进行第三次注射（再次在肩部和大腿部注射）。
9. 用爪抓紧试验锻炼动物以加重肌无力。按以下标准给每只免疫小鼠进行 EAMG 评分：

   0 级＝肌张力正常且无肌无力，即使是在锻炼后（20～30 次连续的爪抓紧笼子顶部的钢栅；图 10. 5. 1A）。

   1 级＝静息时正常而锻炼后出现肌无力，下颚贴在地板上且头部不能抬起，驼背及运动减少。

   2 级＝静息时出现肌无力（图 10. 5. 1B）。

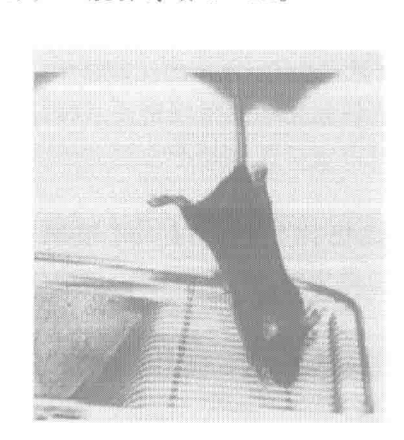
   3 级＝濒死、脱水及瘫痪（四肢瘫痪）。

   肌无力 1 级小鼠可进展为肌无力 2 级或 3 级或维持在肌无力 1 级；肌无力 2 级小鼠可进展为肌无力 3 级。有时急性 MG（肌无力 3 级）可以存活 24h。通常肌无力 3 级小鼠会在 24～48h 内死亡，因此如果观察到肌无力 3 级，应当对小鼠进行安乐死（附录 2G）。应该通过肌电图（EMG，见辅助方案 3）来证实临床 EAMG。
10. 用 PBS 10 倍稀释 300μg/ml 溴新斯的明，用 PBS 10 倍稀释 120μg/ml 硫酸阿托品。

两者等体积混合（终浓度 15μg/ml 溴新斯的明和 6μg/ml 硫酸阿托品）。给出现 EAMG 症状小鼠 i. p. 50μl。观察小鼠 30min 并注意 EAMG 分级情况的改善情况（图 10. 5. 1C）。

通常在注射后 10～20min，肌无力症状会得到明显改善（如从 2 级改善至 1 级或 0 级），一般会持续 1～2h。

A



B

C

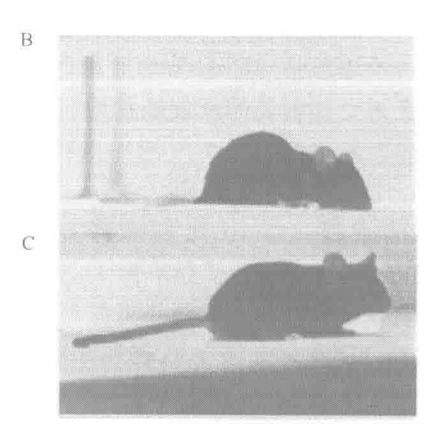


图 10. 5. 1　EAMG 临床评估。A. 手爪抓紧笼子顶部钢栅试验；B. 肌无力 1 级或 2 级动物的姿势；C. 正常小鼠或应用溴新斯的明治疗肌无力 1 级或 2 级后小鼠姿势。

辅助方案 1　AChR 的抽提与亲和纯化

材料（带√项目见附录 1）

Bio-Gel HT 羟（基）磷灰石（Bio-Rad）
√Tris 缓冲液，10 mmol/L，pH7. 5
250g 加利福尼亚鱼雷鱼电板组织（E-PLAX-F，Pacific Bio-Marine Labs），冷冻
√4℃和室温的匀浆缓冲液
Triton X-100 缓冲液
神经毒素 3-琼脂糖（见辅助方案 2）
√胆酸盐缓冲液，0. 2%
√NaCl/ Triton 缓冲液
√氨甲酰基胆碱缓冲液，1mol/L
√柱洗脱液
√洗涤液
蛋白质检测试剂盒
甘油
70%（V/V）乙醇
1. 5cm×20cm Econo 柱，用于低压层析（Bio-Rad）
搅拌器
38. 5ml 顶端开口的超速离心管（Beckman）

超速离心机及 60 Ti 转头（Beckman）

蠕动泵

96 孔板

微孔板计数仪

低温防护瓶

注意：操作步骤 1～8 时需要在 4℃冷室或层析冷房内执行。

1. 混合 25ml HT 羟（基）磷灰石与 100ml Tris 缓冲液，10mmol/L，pH7.5，轻轻混悬，并让其沉淀 5min。轻轻倒出上清液中的超细粉末及底部上层的粉末。重复混悬，沉淀，倾倒直至上清液中无超细粉末（一般需要 4 或 5 次重复过程）。
2. 加入等体积 Tris 缓冲液，10mmol/L，pH7.5，轻轻混悬，倒入 1.5cm×20cm Econo 柱。让2～3cm 珠子在重力的作用下沉降，然后放开柱子的出口并以胶进行填充。当珠子稳定后，以至少 2 倍体积的 Tris 缓冲液，10mmol/L，pH7.5，流过柱子。
3. 在搅拌器中加入 250g 冰冻的电板组织及 2 倍体积的室温匀浆缓冲液。高速匀浆 1min 或直到组织完全匀浆化。将匀浆倒入 38.5ml 超速离心管内。4℃，100 000*g*（31 500r/min 60Ti 转头）离心 30min。弃去上清液。

   正常情况下 250g 冰冻的电板组织能够生产 10～20mg AChR。
4. 用 3 倍体积的 4℃匀浆缓冲液混匀沉淀物。在匀浆缓冲液中加入 0.1 倍体积的 Triton X-100 缓冲液并在 4℃，低速摇床上搅拌过夜（不超过 1d）。如上所述离心，收集上清液（含有 AChR），4℃储存。
5. 在烧瓶内将上清液加入神经毒素 3-琼脂糖并在 4℃摇床上轻轻地振摇过夜。将混合物加入到新鲜 1.5cm×20cm Econo 柱，当混合物已完全包裹柱子时让缓冲液从柱子中流出。当柱子已经被混合物包裹后，让上清液流出柱子直至柱子顶端留有少量液体。在顶端加入 NaCl/ Triton 缓冲液，用 100ml 缓冲液冲洗柱子。
6. 由于检测的是 NaCl/Triton 缓冲液，用胆酸盐缓冲液（0.2%）彻底冲洗神经毒素亲和柱和羟（基）磷灰石柱子直至 280nm 处无吸光度值（A_{280}）。去除两种柱子上层的缓冲液并在顶端加入 1mol/L 氨甲酰基胆碱缓冲液。用 100ml 1mol/L 氨甲酰基胆碱缓冲液冲洗羟（基）磷灰石柱子。
7. 如图 10.5.2 所示用塑料管连接两根柱子并与蠕动泵相连。以 60ml/h 开动泵并循环 14～16h。
8. 移去两根柱子间的连接管，用 500ml 柱冲洗液冲洗羟（基）磷灰石柱。将羟（基）磷灰石柱与成分收集器相连并让 AChR 与流出缓冲液一起流出来。按 80 滴/份，收集约 30 份流出液。
9. 为了鉴别含有蛋白质的层析液，用水按照 1∶5 比例稀释 Bio-Rad 蛋白质检测试剂。以 190μl/孔加入 96 孔板，再加入 10μl/孔各个成分液或蛋白质标准品。
10. 检测 595nm 吸光度值。基于 595nm 处吸光度值收集层析液。确定层析液中的蛋白质浓度。加入 10%（*V/V*）甘油，并用低温防护瓶分装。在含有 70%乙醇或泡沫聚苯乙烯的－70℃冰箱中缓慢冷冻。－70℃储存。

    用 4L NaCl/Triton 缓冲液冲洗可以再应用毒素亲和柱。4℃可储存 1～2 年或使用 4 或 5 次。

11. 应用7.5%聚丙烯酰胺凝胶经SDS-PAGE电泳（单元12.3）分析10～20μl纯化的AChR。用考马氏亮蓝染色（单元12.4）。

凝胶中应出现四条带，分别位于40kDa、50kDa、60kDa和65kDa处。每一次新鲜制备的AChR应当与之前纯化的AChR相比较。

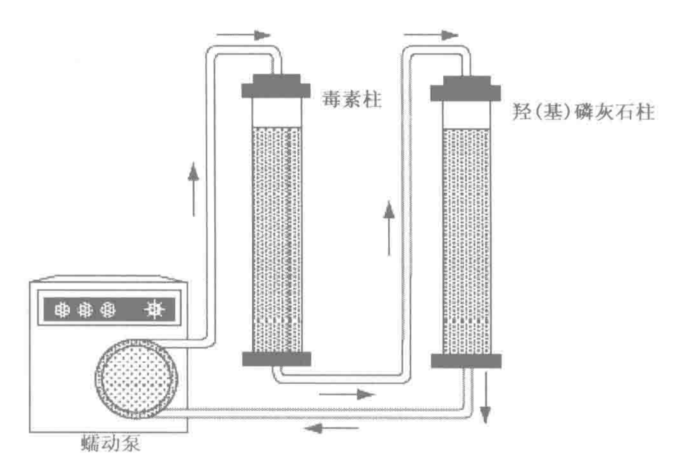


图10.5.2　毒素柱和羟（基）磷灰石柱与蠕动泵之间的连接。

辅助方案2　神经毒素3-琼脂糖的制备

材料（带√项目见附录1）

130～260mg从神经毒素粗提物（Calbiochem）纯化的暹罗眼镜蛇（*Naja naja siamensis*）神经毒素3见Karlsson等（1971），也可以应用从眼镜蛇*Naja naja kaouthia*纯化的神经毒素3（Sigma或Calbiochem）

√偶联缓冲液

7.5g冻干溴化氰活化的交联琼脂糖（Sigma）

1mmol/L HCl

0.2mol/L甘氨酸，pH8.0

√乙酸缓冲液，pH4.0，0.1mol/L

√NaCl/Triton缓冲液

√胆酸盐缓冲液，0.2%

抑菌剂，如1mmol/L叠氮钠溶于PBS（见附录1）

带G3孔的玻璃滤器

振荡器

注意：神经毒素3剧毒，处理神经毒素时应当戴手套和面罩及其他防护设备。

1. 于偶联缓冲液中溶解130～260mg暹罗眼镜蛇神经毒素3使其终浓度达到5～10mg/ml。
2. 将7.5g冻干溴化氰活化的交联的琼脂糖加入1mmol/L HCl 30ml使其胀大15min。在玻璃滤器上用200ml/g干胶1mmol/L HCl冲洗发胀的琼脂糖凝胶，用偶联缓冲液

按 5ml/g 干胶再次冲洗凝胶，立即转入神经毒素 3 溶液中并在振荡器上轻轻混合，室温 2h 或 4℃过夜。

3. 通过测定流出液 A_{280}（毒素的浓度）来间接确定与溴化氰活化的交联琼脂糖结合的数量，以确保获得满意的结合反应。

浓度为 1.0mg/ml 的神经毒素 3 的 A_{280} 值为 1.06。最终制备的凝胶应当含有 0.5μmol 结合型毒素/g 湿胶。

4. 加入 50ml 0.2mol/L 甘氨酸，pH8，4℃静置过夜，以封闭残留的结合反应。为去除过量的未结合神经毒素 3，首先用 4～5 倍体积的偶联缓冲液冲洗吸附物，再用乙酸缓冲液，pH4，0.1mol/L，最后再用偶联缓冲液冲洗。

5. 使用 NaCl/Triton 缓冲液及 0.2% 胆酸盐缓冲液冲洗吸附物。加入抑菌剂（如 1mmol/L 叠氮钠溶于 PBS）并于 4～8℃储存。

神经毒素 3-琼脂糖比自由溶解的毒素稳定。合适的保存方法可以使之再使用许多年。

辅助方案 3　应用肌电图评定 EAMG

附加材料（其他材料见基本方案）

泡沫聚苯乙烯板
辅助带
肌电图仪
电极：地线，正极（刺激），负极，参照，记录电极
凝胶

1. 用无菌水以 1∶10 比例稀释 50mg/ml 戊巴比妥钠。在一间干净、通风良好、排气顺畅的房间里，按 60mg/kg 给小鼠注射戊巴比妥钠（附录 2D）。

2. 将小鼠背部放置在聚苯乙烯板上，用辅助带将其四肢固定。将连接凝胶的地线放置在小鼠胸部并用线固定在板两侧（图 10.5.3A）。将刺激（正极）电极插入小鼠坐骨切迹以刺激坐骨神经并将负极插入小鼠腹壁皮下，将记录电极插入小鼠同一腿的腓肠肌内并将参照电极插入腓肠肌肌腱内。

3. 用 3-Hz 超级刺激坐骨神经 8 次同时记录诱发复合肌动作电位（反应）。通过比较第一次（或第二次）和第四次（或第五次）刺激的诱发电位来评定对重复刺激的反应。

如果比较第四次（或第五次）刺激和第一次（或第二次）刺激的诱发电位显示≥10%增幅递减，表明对超级刺激存在显著的阳性递减反应（图 10.5.3B 和 3C）。这种对反复神经刺激的阳性递减反应对人 MG 和小鼠 EAMG 具有诊断意义。

辅助方案 4　通过检测抗 AChR 抗体来评定 EAMG

由于 EAMG 诱导的致病性抗体与小鼠肌肉 AChR 可以发生交叉反应，可以通过检测血清中抗小鼠肌肉 AChR 抗体来评定 EAMG。本检测方法也可用于检测抗加利福尼亚鱼雷鱼 AChR 抗体来确定机体已经建立对加利福尼亚鱼雷鱼 AChR 的体液免疫应答，然而这种抗体的出现与疾病的发病机制无关。

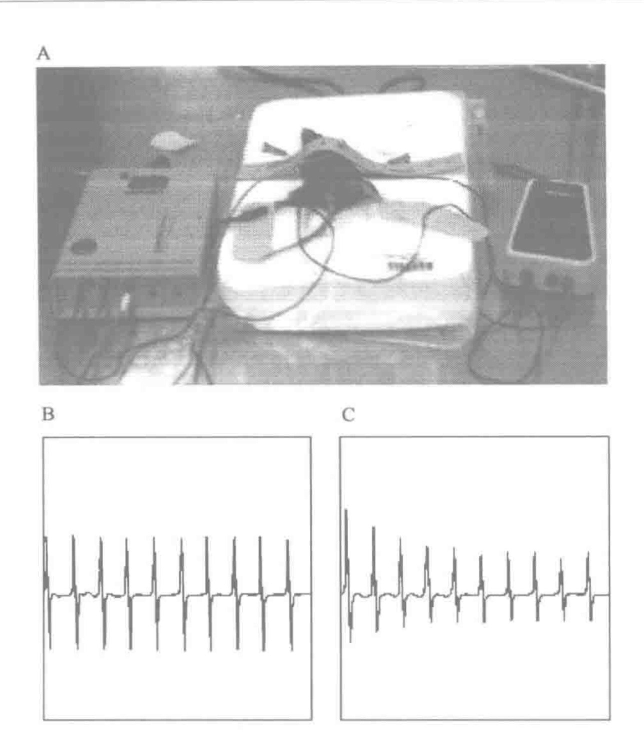


图 10.5.3 应用肌电图描记法评定实验性自身免疫性重症肌无力。A. 肌电图描记法电极位置的照片；B. 正常小鼠对重复神经刺激无明显减弱反应的肌电图；C. EAMG 小鼠对重复神经刺激出现明显（>10%）减弱反应的肌电图（比较第一次和第四次或第五次动作电位）。

材料（带√项目见附录 1）

从正常 C57BL6/J 小鼠中制备的小鼠肌肉 AChR（见辅助方案 5）

√0.5%（*V*/*V*）Triton X-100 缓冲液，4℃

0.2ml 100μCi [^{125}I] α-银环蛇毒素（240Ci/mmol，Amersham）

实验小鼠血清

正常小鼠血清

多克隆兔抗小鼠 Ig（单元 1.2）

12mm×75mm 硼硅酸化玻璃管

Sorvall 离心机和 H-1000B 转头

γ 计数仪（Beckman）

1. 在 12mm×75mm 硼硅酸化玻璃管复管或三复管内混合 0.1ml 小鼠肌肉 AChR（1nmol/L 银环蛇毒素结合位点）与 0.9ml 含有 0.1mCi（2nmol/L）[^{125}I] α-银环蛇毒素的预冷 0.5%（*V*/*V*）Triton X-100 缓冲液。4℃孵育 3～4h。
2. 在 1ml 标记的 AChR 中加入 1μl 实验（如 EAMG）小鼠血清和 9μl 正常小鼠血清（作为载体），用正常小鼠血清作为对照组。混匀后 4℃孵育过夜。
3. 加入 0.1ml 多克隆兔抗小鼠 Ig（用来自免疫小鼠抗 AChR 血清滴定）并于室温孵育

4h，使用足够的抗小鼠血清来沉淀所有的免疫球蛋白。

4. 4℃，3000*g*（3800r/min H-1000B 转头）离心 10min。小心地吸去上清液避免丢失沉淀物。
5. 用 0.5ml 0.5% Triton X-100 缓冲液洗涤沉淀，再次离心，吸去上清液。
6. 在γ计数仪上计数沉淀（免疫沉淀）。计算α-银环蛇毒素结合位点预测血清中抗 AChR 抗体含量。

例如，一个实验样品中结合平均为 1132cpm 而对照为 100cpm，特异性结合是 1132－100＝1032cpm。转换为 dpm，1032 除以 0.5（系数）得到 2064dpm，相当于 9.3836×10^{-10}Ci（2.2×10^{12} dpm/Ci）结合位点，再与被用来标记 AChR 的α-银环蛇毒素特异性活性（240Ci/mmol）相除，则得到 1μl 样品中α-银环蛇毒素结合位点为 3.9×10^{-9}mol/L。

辅助方案 5 小鼠肌肉 AChR 的制备

材料（带√项目见附录 1）

正常未注射过的 C57BL6/J 小鼠
√匀浆缓冲液，4℃
Triton X-100 缓冲液
甘油
带有微型烧瓶的搅拌器（Waring）
15ml 和 50ml 离心管
Beckman 离心机和 JA20 转头
刮勺或玻璃杆
往复摇床
超速离心机及 38.5ml 离心管
15ml 试管
5ml 冻存管

1. 颈脱位法处死 C57BL6/J 小鼠，去除皮肤并取出内脏，称取内脏重量。可先在－70℃冻存内脏以后再抽提 AChR。
2. 将内脏切成小碎片，放入搅拌器的微型烧瓶内，按 4ml/g 内脏加入 4℃匀浆缓冲液（如 8g 组织加入 32ml）。低速搅拌 1min 然后再高速搅拌 1min 直至没有大的碎片存留。
3. 将匀浆加入 50ml 离心管内。每一个小鼠提取物用独立的离心管。
4. 4℃，17 000*g*（15 000r/min，JA20 转头）离心 30min，弃去上清液，避免丢失沉淀物。用刮勺或玻璃杆将沉淀物移入搅拌器内。
5. 根据初始组织重量加入等体积的 4℃匀浆缓冲液（如 8ml）并高速搅拌 1min。
6. 将抽提物置入一个 50ml 离心管并加入 0.1 倍体积的 Triton X-100 缓冲液（约 1.2ml）。用刮勺或玻璃杆轻轻混合。在往复摇床上，4℃，低速振荡 3～4h。
7. 4℃，17 000*g* 离心 30min。移入 38.5ml 超速离心管，4℃，50 000*g* 离心 30min。
8. 吸弃样品表面的油脂层。将存留的上清液倒入一只 15ml 的试管内，丢弃沉淀物，在

抽提液中加入甘油使其终浓度为10%（V/V），高速振荡混合均匀。用5ml冻存管分装，－70℃冻存。

参考文献：Wu *et al.*，1995

撰 稿 人：Bo Wu，Elzbieta Goluszko，and Premkumar Christadoss

单元10.6 NOD小鼠：一种胰岛素依赖性糖尿病模型

非肥胖型糖尿病（NOD）小鼠可自发地发生自身免疫性T细胞介导的胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）。

基本方案1 无特殊病原菌（SPF）级NOD小鼠的饲养

NOD小鼠的一个特性是环境中的病原菌刺激NOD小鼠的免疫系统可导致超常免疫应答并对IDDM抵抗。因此，为表现糖尿病症状，NOD小鼠必须在严格的SPF条件下饲养。在从SPF室获得NOD小鼠之前，每一个研究机构都需要受到兽医机构职员的检查以确保能够具有维持重要小鼠生存的环境。这需要提供空间、高压消毒饮食和休息处、酸化和经过氯化消毒的饮水，以及健康检测。

材料

NOD小鼠（如Jackson Laboratory、Taconic Farms、CLEA、Bomholtgard）及对照小鼠（表10.6.1）

表10.6.1 NOD小鼠潜在的非糖尿病性对照品系

品系	优点	缺点	最佳用途	参考文献
NOR/Lt	NOD来源的重组同类系；MHC相同，相对少的非MHC *Idd*位点不同	出现NOD部分而非所有免疫功能障碍	好的胰岛来源；MHC（$H2^{g7}$）-非MHC相互作用与NOD不同	Prochazka *et al.*，1992a；Serreze *et al.*，1994a
NON/Lt	与NOD密切相关糖尿病抵抗MHC	出现肥胖，葡萄糖耐受受损免疫缺陷，难以饲养	*Idd*基因分析；II糖尿病潜在模型	Leiter *et al.*，1986
ICR（可用于CD-1）	NOD及相关品系的祖系	随机饲养	分析出现于NOD稀有基因多态性的总体频率	Ikegami *et al.*，1990
SWR/J	Swiss来源的与ICR和NOD类似近交系但无免疫缺陷易于获得（Jackson Laboratory）	与NOD基因不同包括MHC	用于NOD某些免疫功能异常的对照	Serreze and Leiter，1988
NOD-Ea^d转基因	与NOD小鼠比较，非糖尿病对照抗原呈递细胞表达I-E分子可从Jackson Laboratory获得	出现NOD部分而非所有免疫功能障碍	分析T细胞发育细胞抗原呈递	Uehira *et al.*，1989；Lund *et al.*，1990；Hanson *et al.*，1996

续表

品系	优点	缺点	最佳用途	参考文献
NOD. NON-$H2^{nb1}$	来自 NON/Lt 小鼠糖尿病抵抗 MHC；可从 Jackson Laboratory 获得	出现 NOD 部分而非所有免疫功能障碍	用于分析出现异常免疫表型时区分 MHC 和非 MHC 基因	Leiter and Serreze, 1991; Serreze and Leiter, 1991
NOD. SWR-$H2^{q}$	来自 SWRIJ 小鼠糖尿病抵抗 MHC；可从 Jackson Laboratory 获得	出现 NOD 部分而非所有免疫功能障碍	用于分析出现异常免疫表型时区分 MHC 和非 MHC 基因	Serreze *et al.*, 1996
NOD. B10-$H2^{b}$	来自 C57BL/10J 小鼠糖尿病抵抗 MHC；可从 Jackson Laboratory 获得	出现 NOD 部分而非所有免疫功能障碍	用于分析出现异常免疫表型时区分 MHC 和非 MHC 基因	Wicker *et al.*, 1992; Todd *et al.*, 1991
NON. NOD-$H2^{g7}$	来自 NOD/Lt 小鼠致糖尿病 MHC；可从 Jackson Laboratory 获得	出现 NOD 部分而非所有免疫功能障碍	用于分析出现异常免疫表型时区分 MHC 和非 MHC 基因	Leiter and Serreze, 1991; Serreze and Leiter, 1991
NOD-scid	无内源性 T 或 B 淋巴细胞功能，可从 Jackson Laboratory 获得	随年龄增加出现高发病率胸腺瘤	用于分析 T 细胞亚群的作用；非胰岛炎性胰岛的来源	Prochazka, 1992b; Christianson *et al.*, 1993; Shultz *et al.*, 1995
NOD. $B2m^{null}$	MHC-I^{-}，CD8 缺陷糖尿病抵抗品系，靶向突变 β2 微球蛋白基因的近交系	CD4 T 细胞对 MHC-I^{+} 同源细胞不耐受	用于移植研究的非胰岛炎性 MHC-I^{-} NOD 胰岛的来源	Serreze *et al.*, 1994b, 1997; Wicker *et al.*, 1994

合适的 SPF 动物饲养所（见 CPI 单元 1.2 和单元 15.9）

高压消毒白色笼子或纸纤维床（Alpha-Dri，Shepard Specialty Papers）

高压消毒小鼠饲料（Paurina 5001，Purina NIH-31）

酸化水（盐酸调节 pH2.8～3.2）或含有 10μl/L 次氯酸钠的经过氯化消毒的水

1. 在接受外源小鼠前检查其 SPF 状态。

   已知小鼠病原体的出现要求将小鼠放在检疫机构内的小隔离筐中，通过剖腹产或胚胎移植繁衍出 SPF 级动物。不仅要确保 NOD 小鼠 IDDM 的高发病率也要保护其他 SPF 小鼠不被新近带入的病原菌感染。

2. 进口小鼠进入 SPF 实验室并由兽医进行清洁后移至动物饲养所交给实验者，完成动物健康状态的检测。给小鼠进食消毒食物和酸化或经过氯化消毒的饮水，并保存在消毒后的笼子内。

   所用来源于小鼠的实验试剂都可能隐含病原菌。例如，用于体内实验的来源于腹水的单克隆抗体，应用前应当进行小鼠病原菌筛选（小鼠抗体产生或 MAP 检测），或在制备动物蛋白时进行 γ 照射或其他适当的处理。

   部分能够降低 NOD 小鼠 IDDM 发病率的病原菌，如小鼠肝炎病毒（murine hepatitis virus，MHV），淋巴细胞性脉络丛脑膜炎（lymphocytic choriomeningitis vivus，LCMV），乳酸脱氢酶病毒（lactate dehydrogenase virus，LDHV）和致脑炎病毒（encephalomyocarditis virus，EMCV）。动物应当避免接触副流感病毒和肺支原体。

3. 建立糖尿病发病率曲线图。8～10 周龄时开始监测小鼠 IDDM 症状（尿糖、血糖及

胰岛炎）（见基本方案 2 及备选方案）。

基本方案 2　胰岛素依赖性糖尿病（IDDM）的诊断

当 NOD 小鼠 0 周龄时开始监测其糖代谢状态。通常间隔一周时间应用尿糖检查剂 Diastix（Bayer Diagnostics）或相似试剂贴检测尿糖。提起小鼠使之立即排尿，滴一滴尿液在试剂贴的检测区（顶端）。当血糖≥300mg/dl 时尿液中会出现高水平的葡萄糖（尿糖）。连续两周非禁食血浆葡萄糖≥300mg/dl 时表明存在 IDDM。年幼的、糖尿病前驱期 NOD 小鼠非禁食血浆葡萄糖的含量为 130～180mg/dl。少量静脉血的血浆葡萄糖可应用检测葡萄糖氧化酶的方法（可以是商业化的葡萄糖分析器或小的便携式分析器和葡萄糖氧化酶包被的检测贴）进行直接测量。腹腔注射环磷酰胺（Sigma；200～300mg/kg）（附录 2E）可以加速年幼的糖尿病前驱期 NOD 小鼠的起始发病。通过胰岛素治疗较难于维持高血糖 NOD 小鼠生存，因为一旦确诊小鼠通常会死掉。3～4 周内会从中度高血糖转变为严重的高血糖。在这个期间即使不用胰岛素治疗小鼠也可以存活。如果应用胰岛素疗法是研究者实验方案的一个部分，欲维持实验需要的高血糖状态需要早上和晚上经腹腔注射 1∶1 混合的 1～2U 常规和缓慢作用的猪胰岛素（Novo Nordisk）。

备选方案　半定量胰岛炎以作为进展为 IDDM 的亚临床表现

胰腺胰岛的白细胞浸润（胰岛炎）是 IDDM 主要的组织病理学表现。

材料（带√项目见附录 1）

NOD 小鼠（见基本方案 1）
√改良的 Bouin 固定液
50%、70%、80%、95%和 100%（*V/V*）乙醇
1∶1（*V/V*）100%二甲苯/100%乙醇
二甲苯
√乙醛品红染色液
Mayer 苏木精（如 Sigma）
1%（*m/V*）伊红 Y 溶于 80%（*V/V*）乙醇
封片剂（如 Permount、HSR、Coverbond）
解剖器械
能够进行石蜡包埋和切片的组织学或病理学实验室
玻璃载玻片
染色缸
盖玻片

1. 通过 CO_2 吸入处死小鼠（附录 2G）。打开腹腔，用镊子抓住脾脏，将脾脏及与之相连的胰腺从腹腔中拉出。用剪刀将胰腺于十二指肠游离开。取出胰腺及与其相连的脾脏，放置在一平面上并用小剪刀将胰腺和脾脏分离。将胰腺放入组织盒内并用改良的 Bouin 固定液浸泡固定 24h。

2. 在缓慢的流水下冲洗胰腺 8～24h 以彻底去除 Bouin 固定液中的乙酸/苦味酸。将胰腺依次经过以下液体进行脱水处理：

50%乙醇	快速
95%乙醇	快速
100%乙醇	2min
100%乙醇（新鲜配制）	3min
100%乙醇（新鲜配制）	5min
1∶1 二甲苯/乙醇	1～1.5min
二甲苯，更换数次	5min/次。

3. 应用石蜡包埋组织（最好在脱水处理的当天），制备 5μm 切片，封固于玻璃载玻片上。通过以下处理将切片脱蜡至水：

二甲苯	5min（2 次）
1∶1 二甲苯/乙醇	1min
100%乙醇	5min
100%乙醇	3min
100%乙醇	2min
95%乙醇	快速
70%乙醇	快速
蒸馏水	漂洗。

4. 将载玻片再次放入 70%新鲜配制的乙醇中 2min，将载玻片浸入过滤后的乙醛品红染色液中 10～13min 染色，用 95%乙醇按以下方式经 2 或 3 次换液冲洗染色后的载玻片：

第 1 次冲洗	30s～1min
第 2 次冲洗	2～3min
第 3 次冲洗	3～5min（可选择；假如载玻片较多）。

5. 用 70%乙醇简单冲洗载玻片，然后再用蒸馏水简单冲洗。将载玻片浸入 Mayer 苏木精染液内 15s（或根据实验经验和苏木精的强度可染色更长时间）。在缓慢的流水下冲洗直至载玻片上颜色呈航海蓝，再用蒸馏水漂洗。
6. 脱水后按以下方案用伊红染色载玻片：

50%乙醇	快速
1%伊红 Y 溶于 80%乙醇通常 15～30s	
95%乙醇	快速
100%乙醇	2min
100%乙醇	3min
100%乙醇	5min
1∶1 二甲苯/乙醇	1～1.5min
二甲苯，更换数次	5min/次。

7. 用封片剂（如 Permount、HSR、Coverbond）在载玻片上封固盖玻片。显微镜下镜检。

假如颗粒化良好则胰岛β细胞会被染成紫红色，如果出现部分脱颗粒则染成浅蓝色。胰腺中的肥大细胞及毛细血管和动脉壁的弹力蛋白也将被染成紫红色。

在相同载玻片上也可以进行标准的品红染色方法。如果愿意，可以在进行乙醛品红染色之前再次脱水时（步骤4）进行。

8. 检测每个胰腺至少3张非重叠切片（包括至少30～40个胰岛），按以下标准判断胰岛浸润程度：

   0级＝无浸润

   1级＝胰岛周边而非侵入胰岛内的血管周围或导管周围出现白细胞浸润

   2级＝白细胞浸润达胰岛大小的25%

   3级＝白细胞浸润达胰岛大小的75%

   4级＝末期胰岛炎，<20%胰岛存在。

9. 按以下公式计算胰岛炎症指数：

$$I=\frac{(0\times n_0)+(1\times n_1)+(2\times n_2)+(3\times n_3)+(4\times n_4)}{4\times(n_0+n_1+n_2+n_3+n_4)}$$

式中，n_0、n_1、n_2、n_3和n_4是分别按照0级、1级、2级、3级和4级评分的胰岛数目。

注意：胰岛炎症指数为1.0表示整个胰岛基本被破坏。尸检NOD小鼠可发现在IDDM发生之前胰腺内已经非常广泛地存在胰岛炎。然而不能根据高胰岛炎指数（>0.5）的组织学表现等同于尚未尸检小鼠就会有IDDM的起始发病。

通过进行葡萄糖耐受试验可以从生理学上估计过夜（如16h）禁食小鼠的胰腺β细胞丢失的程度。在注射大剂量葡萄糖之前检测禁食静脉血血浆或血液（从眼眶内或尾静脉获得）（附录2F）葡萄糖含量。取20%（*m/V*）注射液腹腔注射2g葡萄糖/kg体重（附录2E）。注射后60min采集静脉血样品。如果有足够的胰腺β细胞存活的活血浆或血液葡萄糖应当<300mg/dl。如果测定值不低于该阈值，说明小鼠存在发展为高血糖的危险。

辅助方案　胰腺中胰岛细胞的分离

研究NOD小鼠自身免疫性IDDM时常分离同源胰岛，用于：①作为胰岛炎胰腺组织白细胞的来源而用于被动转移实验；②组织移植治疗糖尿病；③分离T细胞用于建立β细胞自身反应性T细胞系；④作为胰岛抗原的来源在体外维持T细胞系和T细胞克隆。

注意：所有与细胞接触的溶液和仪器必须无菌，因此必须使用相应的消毒技术。

材料（带√项目见附录1）

NOD小鼠或对照小鼠（见基本方案1）

70%（V/V）乙醇

√DNA酶/胶原酶P工作液

√含添加物的HBSS

有反射光的解剖显微镜
动脉止血钳
30G，0.5in 皮下注射针头
10ml 注射器
60mm 玻璃培养皿，无菌
硅化玻璃微量吸管
台式离心机
连接真空装置的橡皮管

1. 通过 CO_2 吸入处死小鼠（附录 2G）并用 70%乙醇擦洗腹部。做腹部切口，翻转皮肤，打开腹腔。为从 NOD 小鼠得到完整的胰岛，要使用不大于 7 周龄的糖尿病前期供者。
2. 将小鼠置于带有反射光源的优质解剖显微镜下，用小动脉止血钳夹闭与十二指肠相连的胆总管（图 10.6.1）。将通过软管连接 10ml 注射器的 30G，0.5in 皮下注射针头插入动脉。通过胆总管将 3ml 室温 DNA 酶/胶原酶 P 工作液灌入胰腺（可以看到胰腺胀大）。

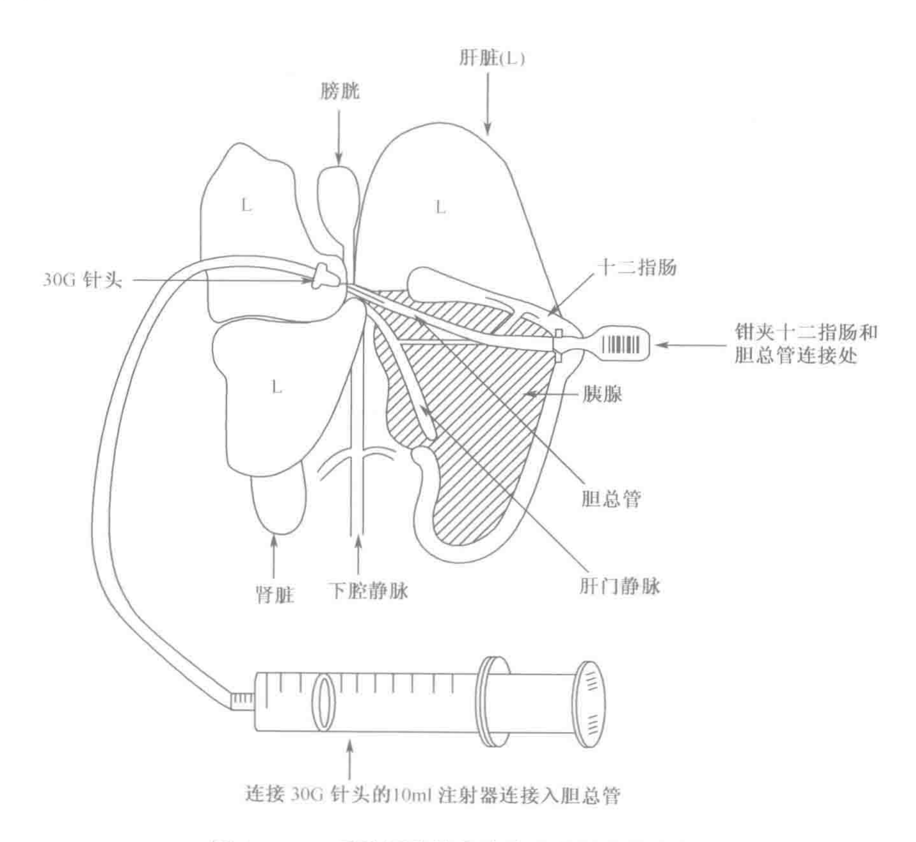


图 10.6.1　用胶原酶消化胰腺以获得胰腺胰岛。

3. 无菌操作切下胀大的胰腺并放入一个无菌 60mm 玻璃培养皿内。小心地将培养皿放入 37℃水浴（确保水没有受污染）并孵育 20min（对其他种类的小鼠需要预实验确

定时间）以消化胰腺。

4. 加入 10ml 含添加物的 HBSS 缓冲液并用硅化玻璃微量吸管分散消化过的胰腺。室温，200g 离心 1min。轻轻地倒出上清液弃去。用 10ml 含添加物的 HBSS 缓冲液重悬成块的胰岛细胞，吹散，同前面一样离心。重复上述洗涤/分散过程 4 次。

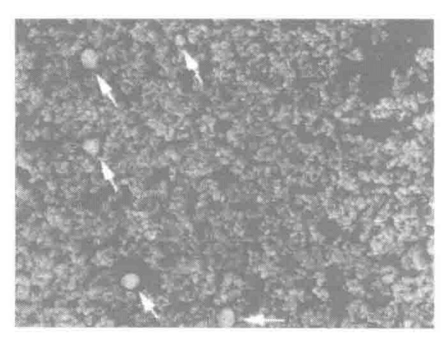


图 10.6.2　消化胰腺获得胰岛细胞（卵圆形）和分散的外分泌细胞（21×放大倍数）。

5. 将来源于一个胰腺的消化物（含有分散的胰岛和外分泌细胞）放入两个无菌 60mm 玻璃培养皿中，在带有反射光源的解剖显微镜下以黑色为背景进行观察。鉴别胰岛，它们是由外分泌细胞组成的“草坪”，呈现卵圆形半透明状（图 10.6.2）。

6. 使用硅化玻璃吸管（最好有微米型吸取装置），从培养皿中吸出挑选的胰岛放入含有 HBSS 缓冲液的另一个培养皿，尽可能不要带入外分泌组织。重复两次上述挑选过程。

如果胰腺被胶原酶溶液适当的充盈，每只 NOD 供者可望获得约 100 个胰岛。

7. 必要时可以使用 Ficoll 梯度方法从分散成单个细胞的胰岛中分离出 T 细胞或 T 细胞亚群（单元 2.2）。

参考文献：Leiter，1993；Leiter and Atkinson，1998

撰 稿 人：Edward H. Leiter

单元 10.7　通过耗竭调节性 T 细胞诱导自身免疫性疾病

使用成年动物胸腺切除术然后给予四次亚致死量的 γ 射线照射（图 10.7.1），在正常的 PVG. $RT1^u$ 大鼠中诱导胰岛素依赖性糖尿病，PVG. $RT1^u$ 大鼠和自发性糖尿病 BB 大鼠具有相同的 MHC 同种异型。疾病的起始发病时间在最后照射后 3～18 周，98%雄性和 70%雌性动物会出现糖尿病。动物出现急性且快速致死性症状并伴有严重的体重丢失和高血糖。

基本方案　通过胸腺切除术诱导年轻的成年大鼠糖尿病

材料

PVG. $RT1^u$ 大鼠，6 周龄（Harlan Bioproducts for Science）

葡萄糖己糖激酶 HK 试剂（Sigma）

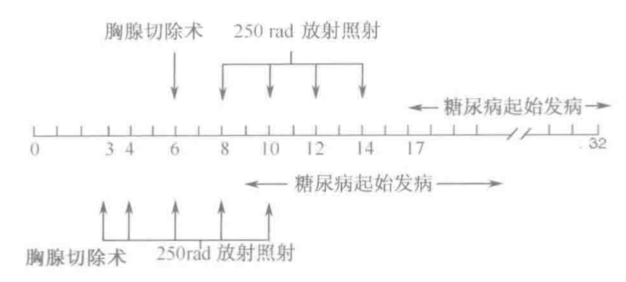
甲氧氟烷

70%（V/V）乙醇

小动物剪刀

解剖板

基本方案



备选方案

图 10.7.1　基本方案（上）和更严重的备选方案（下）的胸腺切除术和放射照射方案。

钝头虹膜剪，无菌

钝头止血钳，无菌

7cm 牵引器（John Weiss），无菌

3 号缝线（Ethicon）

9cm 缝合夹（如 Clay Adams autoclips）及无菌棉棒

γ 放射源（Cs^{137} Gammacell，Atomic Energy of Canada 或等同物）

1. 取 6 周龄 PVG. $RT1^{u}$大鼠血液（附录 2F）并用葡萄糖己糖激酶 HK 试剂按照制造商说明书操作来确定血清葡萄糖基础水平。
2. 用甲氧氟烷麻醉大鼠（附录 2D）。剃去胸部毛发，将大鼠头部朝向手术者仰面朝上放置，固定上肢和腿部。用 70%乙醇擦洗颈部和上胸部。
3. 从颈下到胸部沿中线做 2～2.5cm 皮肤切口。用两把钝头止血钳夹住两个颌下腺之间的结缔组织分离至能够暴露覆盖气管的胸骨舌骨肌（图 A. 2H. 5）。用一把止血钳沿肌肉中线分离胸骨舌骨肌，轻轻推向两旁暴露出气管。
4. 用一副钝头虹膜剪沿中线剪开胸骨柄和胸部肌肉，剪出一个 1～1.5cm 切口进入胸腔。为避免损伤心脏和大血管，应当使剪刀的尖部始终指向上方。进一步分离胸骨舌骨肌的两部分至胸骨柄底部。
5. 插入一个 7cm 的牵引器，并将胸骨柄和胸骨舌骨肌的两部分尽可能宽的牵引以暴露胸腺的顶部。用钝头止血钳抓住胸腺轻轻拉向手术者。当胸腺暴露足够多时，用第二把止血钳夹住胸腺，用两把止血钳持续牵引直到完全分离出胸腺。注意不要弄碎胸腺。
6. 使用 3 号缝线单层缝合胸骨柄。用 3 或 4 个 9cm 缝合夹关闭皮肤。清洁切口血液并将动物放回洁净的笼子。
7. 胸腺切除术后两周，将动物暴露于 250rad γ 射线。每间隔两周重复放射照射 3 次。在最后照射后间隔一天称重。当动物开始出现体重下降后，采集血样。用葡萄糖己糖激酶（HK）试剂按照说明书操作来确定血清葡萄糖含量。

备选方案　应用胸腺切除术诱导 3 周龄大鼠糖尿病

附加材料（见基本方案）

PVG. $RT1^u$ 大鼠，3 周龄，40～55g（Harlan Bioproducts for Science）
1ml 注射器针筒
尖嘴止血钳，无菌
弯止血钳，无菌
玻璃吸引套管：巴斯德滴管去除顶端 5～6cm（如刚好在锥形管上方，留下 4mm 开口）用火焰抛光
水吸引器
加热灯

1. 准备用于手术的 3 周龄 PVG. $RT1^u$ 大鼠（见基本方案，步骤 1～2）。用丝线套住门齿并拉紧以延长颈部。将 1ml 注射器针筒放在肩下以帮助向前推胸腺。用 70%乙醇擦洗颈部和上胸部。
2. 从颈下到胸部沿中线做 1～1.5cm 皮肤切口。用两把钝头止血钳抓住两个颌下腺之间的结缔组织分离至能够暴露覆盖气管的胸骨舌骨肌（图 A.2H.5）。用一把尖嘴止血钳沿肌肉中线将胸骨舌骨肌分为两片。
3. 插入一个弯止血钳的尖部游离胸骨舌骨肌。插入玻璃吸引套管应用水吸引器吸引。使用温和操作将胸腺吸至套管内。移去止血钳并用 9cm 缝合夹关闭皮肤。清洁切口血液并将动物放回洁净的笼子。用加热灯保温。
4. 胸腺切除术后 1 周，将动物暴露于 250rad γ 射线。每间隔两周重复放射照射 3 次。如前所述称取体重并测量血清葡萄糖含量（见基本方案中步骤 7）。

参考文献：Fowell *et al.*，1991

撰 稿 人：Steve Simmonds and Don Mason

单元 10.8　通过耗竭调节性 T 细胞诱导免疫缺陷小鼠炎症性肠道疾病

结肠炎的严重联合免疫缺陷（severe combined immunodeficiency，SCID）模型与人类原发性炎症性肠道疾病（IBD）有许多相同的特征。给 C. B-17 SCID 小鼠转输来源于 BALB/c 小鼠的 $CD45RB^{high}$ $CD4^+$ T 细胞可以作为一个例子，但是本模型也适用于其他种类动物。

基本方案　转输 $CD45RB^{high}$ $CD4^+$ T 细胞诱导 SCID 小鼠 IBD

材料（带√项目见附录 1）

雌性 BALB/c 小鼠，8～10 周龄
雌性 C. B-17 SCID 小鼠，8～10 周龄

√HBSS/BSA

√PBS 及 2×PBS

0.025%（m/V）台盼蓝

√抗抗体混合剂

M450 抗 IgG 包被磁珠（Dynal，Advanced Magnetic）

√PBS/BSA

PE 标记抗 CD4 抗体（CD4-PE Caltag）

FITC 标记抗 CD45RB 抗体（CD45RB-FITC；Pharmingen）

FITC 和 PE 标记同型对照抗体

√热灭活胎牛血清

100 目无色钢网（Fisher 或等同物）

5ml 一次性注射器

15ml 及 50ml 锥底聚丙烯离心管

尼龙细胞滤器（Falcon）

MPC-1 磁性浓聚器（Dynal 或等同物）

振荡器（Dynal 或等同物）

4ml 聚苯乙烯细胞分选管

电子细胞分选仪

托盘天平

注意：所有操作要在 4℃下进行。

1. 用 20ml HBSS/BSA 缓冲液复苏来源于雌性 BALB/c 小鼠的 10 个脾脏（附录 2H）（将会产生 1×10^7 个 $CD45RB^{high}$ $CD4^+$ T 细胞）。用 5ml 一次性注射器针芯挤压脾脏通过 100 目钢网制成单细胞悬液（单元 2.1）。用 HBSS/BSA 缓冲液冲洗钢网加入单细胞悬液内。
2. 将细胞转移至两只 50ml 锥形聚丙烯离心管中。4℃，450g 离心 7min 浓集细胞。吸出上清液并在振荡器上振荡存留的团块。振荡时每个离心管中加入 2ml 蒸馏水，随即迅速在每一离心管内加入 2ml 2×PBS。
3. 用 HBSS/BSA 缓冲液调节每一离心管内液体体积达 20ml。将两个离心管的内容物集中在一起并滤过尼龙细胞滤器。同上所述浓集细胞并用 40ml HBSS/BSA 缓冲液重悬。应用 0.025%台盼蓝染色判断细胞活力并计数细胞。
4. 同上所述浓集细胞，重悬于抗抗体混合剂中 2×10^8 个细胞/ml，4℃孵育 30min 以耗竭 B 细胞、$CD8^+$ T 细胞和巨噬细胞。
5. 按 1∶1 比例确定所需 M450 抗 IgG 包被磁珠的数量。剧烈混合储存瓶中的磁珠并取出所需数量的磁珠加入含有 7ml PBS 的 15ml 锥底聚丙烯离心管内。
6. 同上所述浓集抗体结合细胞，用 40ml PBS/BSA 缓冲液洗涤两次，按 10^8 个细胞/ml 重悬于 PBS 中。在 15ml 锥底聚丙烯离心管内混合细胞和磁珠，置于振荡器上，4℃混合 30min。
7. 如单元 8.3 所述磁性分离结合于磁珠的抗体标记细胞。将未耗竭细胞移入一 15ml 离心管并再次磁性分离以确保去除所有的磁珠。转移细胞悬液至 50ml 离心管内并用

40ml PBS/BSA 缓冲液洗涤两次。

8. 使用台盼蓝拒染法再次计数有活力细胞。为细胞分选分别准备 5 份 5×10^5 个细胞至 4ml 聚苯乙烯管内作为对照。
9. 同上所述浓集剩余的细胞并按 10^7 个细胞/100ml PBS/BSA 缓冲液重悬于含有 2μg/ml CD4-PE 及 15μg/ml CD45RB-FITC 的 15ml 离心管内，4℃孵育 30min。
10. 在孵育期间，4℃，450g 离心 5min 浓集对照细胞（步骤 8），重悬于含有如下成分之一的 50ml PBS/BSA 缓冲液内：

    a 管：空白

    b 管：15μg/ml FITC 标记同型对照抗体

    c 管：1μg/ml PE 标记同型对照抗体

    d 管：15μg/ml CD45RB-FITC

    e 管：1μg/ml CD4-PE。

    4℃孵育 30min 然后用 3ml PBS/BSA 缓冲液洗涤两次。用 300ml PBS/BSA 缓冲液重悬细胞，4℃储存直至分析时。
11. 沉淀标记的细胞（步骤 9）并用 12ml PBS/BSA 缓冲液洗涤两次。用 PBS/BSA 缓冲液重悬细胞浓度为 1×10^7 个细胞/ml，4℃储存直至分析时。
12. 在细胞分选仪上分选未标记细胞（步骤 10，a 管）和其他同型抗体标记的细胞（b 管和 c 管）。确定 FITC 和 PE 双色分析合适的补偿（单元 4.1），并分析 CD45RB-FITC 标记的细胞（d 管）或 CD4-PE 标记的细胞（e 管）。
13. 在细胞分选仪上分析双标细胞（步骤 11）并利用同型抗体设立合适的门（单元 4.1）。以 5000 个/s 的速度使细胞通过仪器并收集至含有 100μl 热灭活 FBS 的 4ml 试管内。运用前相散射门值和侧相散射门值排除死亡细胞（单元 4.1）。如图 10.8.1 所示分选出 $CD4^+$ $CD45RB^{high}$ T 细胞和 $CD4^+CD45RB^{low}$ T 细胞。
14. 沉淀初始收集管中的细胞（4℃，450g 离心 5min），重悬于 20ml PBS/BSA，移入 15ml 离心管。用台盼蓝拒染法计数有活力细胞。从每一管中取出 1×10^5 个细胞再次分析所分选细胞的纯度。
15. 4℃，450g 离心 5min 沉淀合并的分选细胞。用 PBS 重悬 $CD45RB^{high}$ $CD4^+$ T 细胞浓度为 4×10^6 个细胞/ml，重悬 $CD45RB^{low}$ $CD4^+$ T 细胞浓度为 2×10^6 个细胞/ml。
16. 为诱导结肠炎，每只免疫缺陷小鼠需用 4×10^5 个 $CD45RB^{high}$ $CD4^+$ T 细胞（100μl），用等体积 PBS 稀释，给每只雌性 C. B-17 SCID 小鼠经腹腔注射 200μl（附录 2E）。为使受者不发生 IBD，混合 4×10^5 个 $CD45RB^{high}$ 和 2×10^5 个 $CD45RB^{low}$ $CD4^+$ T 细胞（各 100μl 悬液）并同上方法注射 200μl 混合液。
17. 标记小鼠，如在耳朵上打洞。转输 T 细胞后立即用托盘天平给小鼠称重，以后每周称重。

辅助方案　监测 IBD 进展

IBD 的进展伴随进行性的体重下降及含有高比例黏液状稀便。对结肠的组织学分析可以做出诊断。典型的损伤包括黏膜层和肌肉层单个核细胞的浸润、上皮细胞大量增生、溃疡形成及分泌黏液素的杯状细胞缺失。

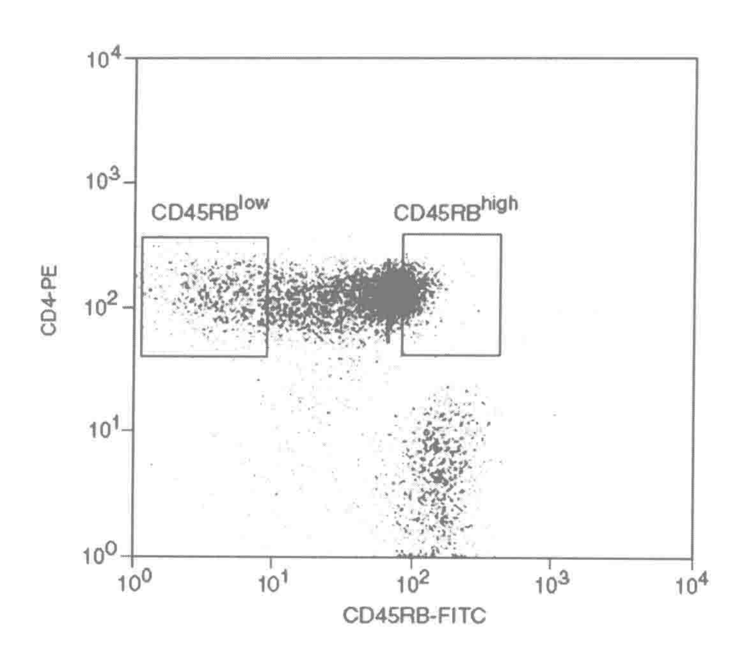


图 10.8.1　用 CD4-PE 和 CD45RB-FITC 抗体染色富集 $CD4^+$ T 细胞的脾脏细胞。

材料（带√项目见附录 1）

转输 T 细胞的雌性 C. B-17 SCID 小鼠，每周称重（见基本方案）
√PBS，冰冷
10%（V/V）福尔马林缓冲液（Baxter）
苏木精复染液（Mayer's Sigma）
解剖器械
19G 钝头针
组织病理标本盒（Fisher）
记号笔（Fisher）

1. 当用 T 细胞处理的小鼠出现稀便或体重下降到初始体重的 10%～20%时（通常在细胞转输后 6～8 周），用 100%CO_2处死小鼠（附录 2G）。打开腹腔，切下肛门以上、盲肠以下的结肠，放入冰冷的 PBS 中。用 19G 钝头针头吸取 PBS 冲洗出肠内容物。
2. 分别切取 1cm 结肠升段、弯曲部和降段结肠并放入组织标本盒中。编号并用记号笔标记。10% 福尔马林缓冲液固定≥24h（在进一步处理标本前可以在福尔马林缓冲液中放置 2 周）。石蜡包埋并切成 2～3 张 5μm 横切片。封固显微玻片并用苏木精染液复染。
3. 用光学显微镜分析组织切片以确定肠道炎症的程度。如表 10.8.1 所示进行从 0 级（无变化）至 4 级（非常严重）的半定量分级。

结果用组中每一个小鼠个体分级的平均值加标准误表示。组间差异的显著性可

用非配对资料统计分析，如 Wilcox 秩和检验。必须由熟悉结肠正常和病理组织学特征的人来双盲评分。

表 10.8.1 IBD 小鼠组织病理学变化分级

级别	损伤性状描述
0	正常结肠；黏膜内有少量白细胞；隐窝内有大量杯状细胞
1	轻度上皮细胞增生及黏膜内白细胞数量增加
2	上皮细胞增生显著（隐窝段 2～3 倍增加）；黏膜内及黏膜下明显白细胞浸润；黏液分泌性杯状细胞缺失
3	上皮细胞增生明显（隐窝段直至 10 倍增加）；黏膜内、黏膜下及肌层白细胞广泛浸润；溃疡形成；黏液分泌性杯状细胞严重缺失
4	上皮细胞增生明显（隐窝段直至 10 倍增加）及溃疡；从黏膜下直至浆膜层广泛性白细胞透壁浸润（有时出现于肠系膜，有时呈现为肉芽肿）；黏液分泌性杯状细胞实质性缺失（>50%）；隐窝脓肿

参考文献：Powrie *et al.*，1996

撰 稿 人：Simon Read and Fiona Powrie

单元 10.9 气道高反应性动物模型

气道炎症和气道超敏反应（AHR）是支气管哮喘的特征性标志。尽管也曾用其他的抗原如豕草和重组猫变应原 FelD1 来致敏和激发动物，但 OVA 常用作标准变应原。

注意：确保试验室通风良好以避免实验人员对 OVA 过敏。

基本方案 应用 OVA 全身致敏及气道激发诱导气道超敏反应

重复注射变应原与明矾佐剂混合物诱导强烈、持久的 Th2 型免疫应答性过敏反应并产生变应原特异性 IgE 和 IgG1。致敏小鼠气道激发可以诱发嗜酸性粒细胞浸润为主的气道炎症，以及以后的 AHR。仅致敏小鼠不能发展为过敏反应。

材料（带√项目见附录 1）

任意种类的雌性小鼠（如 Jackson Lab），6～12 周龄，无病原菌，无 OVA 饮食（食物中不含有鸡蛋黄成分，如标签营养信息注明）

40%及 1%（*m*/*V*）鸡 OVA（V 级，Sigma）溶于无菌 PBS

√PBS，无菌

氢氧化铝明矾溶液（Pierce）

超声雾化器（如 De Vilbiss 公司的 PulmoSonic model 25）

带可移动盖和出入口的 30cm×30cm×20cm 丙烯酸树脂盒（技术部门制造或仪器商店）

1. 按 1∶1 比例混合 40% OVA 和明矾溶液并于 37℃在水平振荡器上振荡 30min。于第 1 天和第 14 天，给小鼠腹腔注射（附录 2E）100μl 混合液（含有 20mg OVA 及 2mg 明矾）。每次实验包括致敏/激发小鼠 4 只，治疗组（如抗体疗法）4 只，阴性对照组

4 只。阴性对照组小鼠用假性致敏或激发（仅使用 PBS）。重复实验 2 次使每个试验组总共有 12 只小鼠。

2. 第 28 天，在 30cm×30cm×20cm 丙烯酸树脂盒内放入至多 8 只小鼠（一次处理 8 只以上小鼠会降低敏感程度）。在用密封的塑料管连接超声雾化器的盒子的入口端雾化溶于 PBS 的 1% OVA（图 10.9.1）。让小鼠暴露于 OVA 雾化剂中 20min，保持持续的 5Pa 压力。第 29 天和第 30 天重复上述试验。
3. 第 32 天，通过全身体积气压描记器评定小鼠气道反应性（见辅助方案 1）。同一天，评定 T 细胞的功能和炎症（见辅助方案 3）。

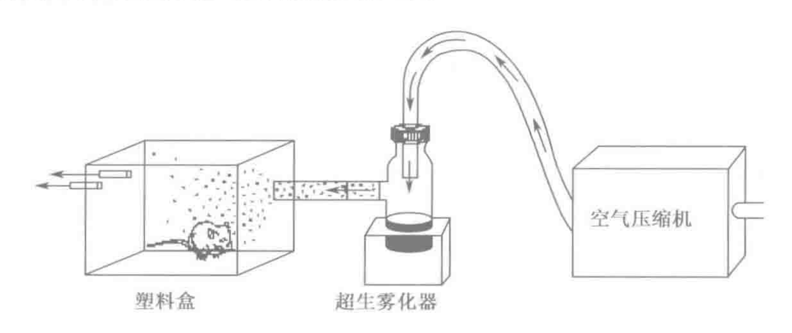


图 10.9.1　气道激发装置。

辅助方案 1　使用全身体积气压描记器非侵入性检测气道反应性

将未麻醉能自主呼吸的小鼠放入仪器，检测对一种吸入性刺激的气道反应。乙酰胆碱是一种非特异性支气管收缩刺激剂，也可用来评定人类患者的肺功能，故能够用来确定非特异性 AHR。

材料（带√项目见附录 1）

OVA 致敏/激发及对照小鼠（见基本方案）

乙酰胆碱（MCh；Sigma）用 PBS 配成 50mg/ml、25mg/ml、12.5mg/ml、6.25mg/ml

√PBS，无菌

全身体积气压描记器（WBP；图 10.9.2）带有前置放大器和压力传导管（Buxco）

超声雾化器

橡皮塞

资料采集卡（Buxco）

气流参数分析软件包（Buxco）

计算机（最小 75MHz Phentium，16MB RAM）和监视器

统计分析软件包（如 JMP、SPSS 等）

注意：当食入或吸入及直接接触乙酰胆碱时，对眼睛、鼻子和气道有刺激性。整个实验过程中需要戴手套和眼镜，在雾化时保证适当的通风。

1. 连接 WBP 主要入口和雾化器，侧面入气孔连接气压泵，橡皮塞紧密塞住 WBP 出

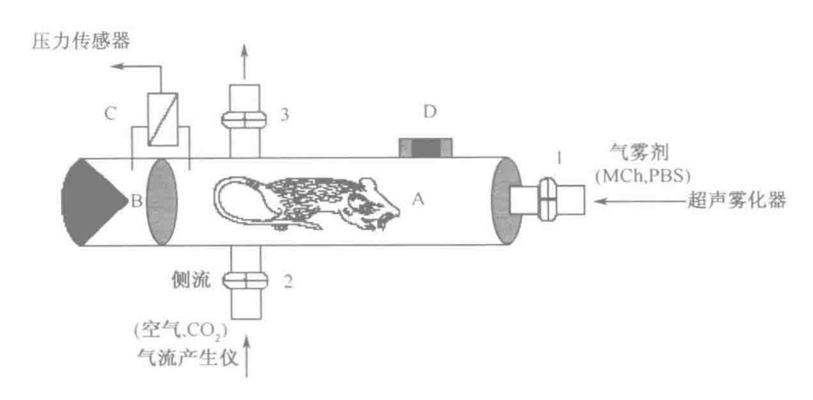


图 10.9.2　WBP 流程示意图。A. 装有小鼠的主仓；B. 参照仓；C. 压力传感器连接分析仪；D. 呼吸速率计。1. 气雾剂主入口由阀门关闭；2. 侧入口装有四通道开关；3. 气雾剂出口装有四通道开关。

口。压力传感器连接主仓出口和参考仓。将压力传感器与前置放大器连接，带有资料采集卡（Buxco）的计算机连接前置放大器。

2. 利用软件按照供应商的要求校准前置放大器。

　　最多可以同时测量并记录 8 只小鼠的资料。一般最好一次操作 4 只小鼠。每只小鼠需要一套由 WBP 前置放大器和压力传感器组成的仪器。

3. 将小鼠放入 WBP 的主仓内并记录 3min 基本读数（$Penh_{base}$）。使小鼠暴露于雾化的 PBS 并记录 3min 读数（$Penh_{PBS}$）。使用逐步增加浓度的 MCh（倍比稀释）3.125mg/ml，6.25mg/ml，12.5mg/ml，25mg/ml 及 50mg/ml 重复上述测量。

　　对于高反应性种类的小鼠（BALB/c），将变应原致敏和激发过的小鼠暴露于 25mg/ml 和 50mg/ml MCh 会导致死亡。仔细观察高浓度吸入组的每只小鼠的反应，必要时早些停止吸入。观察呼吸缓慢（正常频率＞100/min），呼吸暂停及眼睛突出。

4. 计算每只小鼠每 3min 记录的平均 Penh。计算每一个 MCh 浓度点时 $Penh_{MCh}$ 较 $Penh_{PBS}$ 增加的倍数 Penh。$Penh = Penh_{MCh}/Penh_{PBS}$。

　　气道反应性表示为“增加值 Penh”，可作为反映气道功能变化的参数。Penh 是一种实验性参数，反映盒中吸气和呼气时流量波形的变化，与呼吸早期和晚期盒中气压比较相一致；具体见图 10.9.3。

5. 将变应原致敏/激发小鼠与对照小鼠进行比较：每一组的全部资料用均数±标准误来表示。运用多组比较来分析组间差别（变异度分析或 ANOVA）；用 Student's *t* 检验分析 MCh 剂量组之间的差别；用 Tukey-Kramer HSD 检验比较所有组间或组内差别。

备选方案　OVA 致敏气道诱导气道超敏反应

直接通过气道致敏是模拟空气变应原致敏的固有模式。因为未使用任何佐剂，IgE 的产生和气道炎症反应低于全身致敏。材料见基本方案。

1. 如前所述，在一个塑料盒里最多可放置 8 只小鼠于雾化的溶于 PBS 的 1%OVA 中暴露 20min（见基本方案，步骤 2）。每日重复一次，共 10d。对于阴性对照，仅使

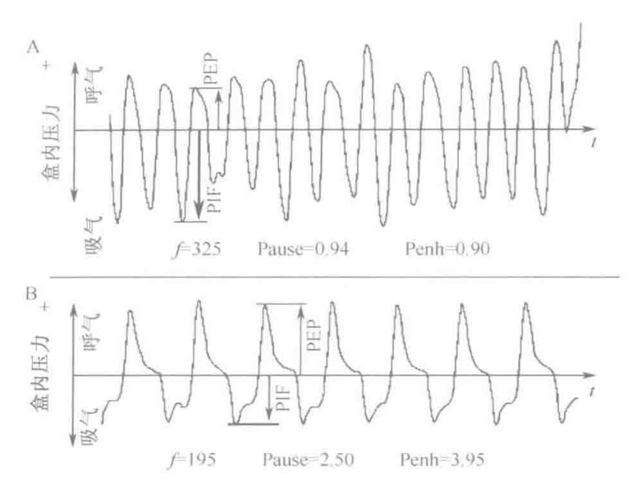


图 10.9.3　MCh 刺激引起盒内气流波形的变化。盒内气流波形来源于正常小鼠受到 PBS 雾化剂（A）或 MCh 雾化剂（B）（50mg/ml 溶于 PBS）雾化 3min。f，呼吸频率（呼吸/ min）；Penh，延长型暂停；PIF，最大吸气量；PEF，最大呼气量。暂停的定义是（$t_{呼吸}-t_{休息}$）/ $t_{休息}$，而 $t_{休息}$ 是压力衰减至总的呼吸压力信号的 36% 时的时间。

用 PBS。

2. 第 12 天，通过电场刺激实验（见辅助方案 2）评定小鼠气道反应性。同一天检测 T 细胞功能和炎症（见辅助方案 3）。

辅助方案 2　体外检测气道对电场刺激的反应性

材料（带√项目见附录 1）

OVA 处理的气道致敏及对照小鼠（见备选方案）
95% O_2/5% CO_2 混合气体，37℃，pH7.43，维持于 37℃
√Krebs-Henseleit 溶液，37℃
解剖器械
器官池（Harvard Apparatus）
三角形不锈钢组织支架
玻璃钩
金属线
等长压力传感器（FT .03 ，Grass Instrument 或等同物）
连接刺激溶液设备的 Grass S44 stimulator（SIU 5，Grass Instrument）
张力记录仪（Model R612，Sensor Medics）

1. 颈脱位法处死小鼠（附录 2G），制备长度 0.5cm 的气管平滑肌片段并去除疏松结缔组织。确保不损伤气管而且不要广泛地清除肌肉片段。

   可以同时测量并记录来源于 8 只小鼠的肌肉标本。每只小鼠（每个标本）需要一个水池和传感器。

2. 在器官池中放入组织，用三角形不锈钢组织支架纵向支撑，浸泡入 37℃ Krebs-

Henseleit 溶液（图 10.9.4）。确保标本的膜部分放置在支架之间以便最大化记录等长挤压所产生的张力。

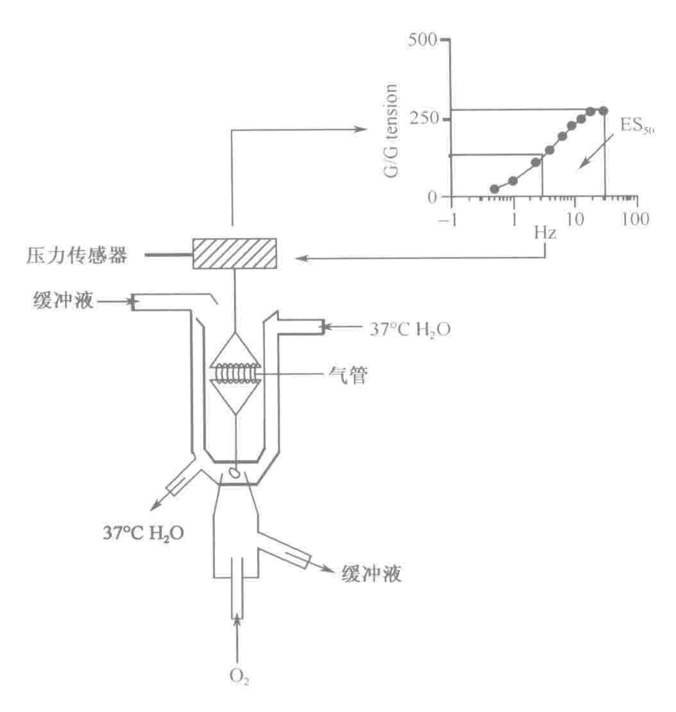


图 10.9.4 监测气管平滑肌对电场刺激反应的装置示意图。G/G tension 表示每克组织受到的克压力。

3. 在 Krebs-Henseleit 溶液中吹入 95% O_2/5% CO_2 混合气体，37℃（pH7.43），冲洗组织。支架下面用玻璃钩支撑于器官池底部，支架上面则用金属线与等长压力传感器相连。通过压力传感器维持 1.5g 的压力来平衡池中每一个组织片段 90min。
4. 从 0.5Hz 至 50Hz 分 5 步增加形成电压梯度刺激组织，维持每一次刺激直到获得最大肌肉收缩反应。记录静息张力和每一次刺激后张力。连续刺激之间允许肌肉恢复 2min。

   对于小鼠气道，40Hz 电压能够产生最大的收缩反应伴随最小的组织损伤。
5. 在每一次试验的最后，吸去纱布垫上的气管片段并给组织称重。可以用等长张力（g）除以气管片段重量（g）表达张力或用占电场刺激（EFS）最大张力的百分率来表达张力，如达到 50%最大张力的电频（ES_{50}）。

辅助方案 3 T 细胞功能和气道炎症的评定

在应用变应原致敏和气道激发的过程中，可通过对免疫学和组织学变化的检测来评定致敏的效果，特别是变应原特异性 T 细胞应答偏向于产生 Th2 型细胞因子（如 IL-4 和 IL-5）及气道的嗜酸性粒细胞性炎症皆为变应原致敏的特征性标志。应当多次试验用于刺激细胞的变应原的剂量以选择适合刺激 T 细胞增殖的最佳条件。通过收集支气管肺泡灌洗液中的嗜酸性粒细胞或制备肺组织切片来计数嗜酸性粒细胞。通过标准夹心

类型 ELISA 检测变应原特异性 Ig 的水平。实验目的决定选择检测的方法。对于肺功能的检测最好能够在同一天或次日完成。

参考文献：Hamelmann *et al.*，1996，1997

撰 稿 人：Eckard Hamelmann and Erwin W. Gelfand

单元 10.10　诱导小鼠 TNBS 结肠炎

TNBS 结肠炎是人类炎症性肠道疾病（如克罗恩病）的模型。

基本方案　小鼠 TNBS 结肠炎的诱导和评定

为建立 TNBS 结肠炎作为动物模型，需要预实验证实所诱导的疾病为 $CD4^+$ T 细胞介导的 Th1 疾病过程。患病小鼠比仅给予乙醇（TNBS 的溶剂）的小鼠有更严重和更持久的进行性体重下降。与毒性反应所致的死亡率开始高而后降低相比较，TNBS 结肠炎小鼠死亡率随着体重的降低而明显增加。在开始使用 TNBS 结肠炎进行实验之前需要优化影响初始毒性反应及随后的 Th1 应答的因素。由于疾病严重程度的可变性，治疗组需要使用足够数量的动物。当比较不同的体内治疗时，每组至少使用 10 只小鼠。用给予乙醇作为对照组是恰当的。

注意：TNBS 有毒，避免接触皮肤，应当戴手套并谨慎操作。

材料

2，4，6-三硝基苯磺酸（TNBS，Sigma），4℃储存＜3 个月，如果发现沉淀则丢弃

45%～50%（V/V）乙醇

已知体重的雄性 5～6 周龄小鼠（最好是 SJL/J；表 10.10.1）

吸入性麻醉剂（如甲氧氟烷、异氟烷、氟烷）

外科润滑剂（如消毒的外科润滑剂；E. Fougera）

3.5-French 38cm，聚氨酯导尿管

1ml 一次性注射器

表 10.10.1　TNBS 诱导的结肠炎易感小鼠

种类	单倍型	分类
ASW/Sn	$H\text{-}2^5$	中等
BALB/c	$H\text{-}2^d$	易感
C_3H/He^{OU}	$H\text{-}2^K$	中等
C57/B6	$H\text{-}2^b$	抵抗
C57/B10	$H\text{-}2^b$	抵抗
DBA/2	$H\text{-}2^d$	抵抗
SJL	$H\text{-}2^5$	高度敏感

1. 制备 0.5～4.0mg TNBS 溶于 45%～50%乙醇，每只小鼠用量 150μl。临用前制备，4℃避光保存（TNBS 对光敏感且在室温下不稳定）。

   0.5～3.75mg TNBS 可导致超急性到慢性疾病，更高剂量（＞3.75mg）会引起更多急性死亡。

2. 将已知体重的雄性 5～6 周龄小鼠（最好是 SJL/J）放入装有吸入性麻醉剂（如甲氧氟烷、异氟烷、氟烷；附录 2D）的玻璃室内轻度麻醉。使用非常轻的麻醉，延长麻

醉时间来增加 TNBS 溶液和结肠接触的时间。理想的情况是生长性参数如呼吸频率无明显减少。

3. 用 1ml 一次性注射器将 TNBS 溶液注入一个 3.5-French 38cm 聚氨酯导尿管内。将导尿管尖部浸入外科润滑剂中润滑其末端。抓住麻醉后小鼠的尾巴，插入导尿管至肛门内 0.5～1cm，往直肠内注射 50μl TNBS 混合物。小心地向前推进导尿管直至将 4cm 的导尿管全部插入结肠内并缓慢注入剩余 100μl TNBS 混合物。在将小鼠放回笼子之前抓住小鼠尾巴使之头朝下，垂直竖立小鼠 30s，使 TNBS 混合物分散均匀。
4. 从注射前开始每天称取小鼠体重。从体重开始下降时计算体重下降百分率。

   由于乙醇对黏膜造成的非特异性毒性破坏作用会导致开始时体重下降10%～15%。2～3d 后，用 45%乙醇处理小鼠开始出现体重降低，随后很快出现体重下降。
5. 处死小鼠并分离肠系膜淋巴结细胞（MLNC；见辅助方案 1）和（或）黏膜固有层单个核细胞（LPMC；见辅助方案 2），或在诱导结肠炎的第 3 天或以后取组织做病理切片。在分离 MLNC 和 LPMC 时，首先解剖 MLNC，由于取出结肠后解剖结构会发生改变，使 MLNC 难以鉴别。做病理切片时，为探测或持久或非严重性的斑片状病损，纵向和横向切片都要使用。

   一只已确定为 TNBS 结肠炎的小鼠的黏膜固有层会产生 1×10^6 个 LPMC，其肠系膜淋巴结会产生 1×10^7 个 MLNC。
6. 用 10%PBS 缓冲液配制的福尔马林固定结肠（也可见 CPI 单元 21.4）并转移至组织学试验室进行石蜡包埋和 H&E 染色（也可见 CPI 单元 12.8）。检查组织切片并按总结于表 10.10.2 的分级标准进行评分。

表 10.10.2　TNBS 结肠炎组织学评分

分级	组织学表现
0	无炎症表现
1	低水平白细胞浸润，高倍镜下可见浸润<10%。无结构变化
2	中等程度白细胞浸润，高倍镜下可见浸润 10%～25%，隐窝伸长，肠壁增厚未超过黏膜层，无溃疡
3	高水平白细胞浸润，高倍镜下可见浸润 25%～50%，隐窝伸长，肠壁浸润超过黏膜层，肠壁增厚并出现浅表性溃疡
4	明显的白细胞透壁浸润，高倍镜下可见浸润>50%，隐窝伸长扭曲，肠壁增厚并出现广泛性溃疡

辅助方案 1　分离小鼠肠系膜淋巴结细胞

已确定为 TNBS 结肠炎的小鼠的肠系膜淋巴结含有大量已活化和已分化的 T 淋巴细胞（2×10^7 个细胞/只小鼠）。MLNC 较 LPMC 易于分离，但是两种细胞具有不同的细胞表型。

材料（带√项目见附录 1）

TNBS 处理的小鼠（见基本方案）
69%（V/V）乙醇
√无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} HBSS 缓冲液
手术器械，无菌：剪刀、镊子、手术刀或刀片

10cm 培养皿
注射器内芯
$40\mu m$ 和 $100\mu m$ 尼龙细胞滤器
50ml 锥形管

1. 用 69%乙醇消毒已处死小鼠的腹部皮肤以防止毛发和细菌污染。用手术刀纵向和水平方向切开皮肤和腹膜打开腹腔。在腹腔内将腹部脂肪向下折叠并将小肠推向小鼠的左侧。提起盲肠，分辨从回肠末端和盲肠发出并返回腹膜后腔的肠系膜血管丛和淋巴结。

   肠系膜脂肪组织使得辨别和解剖淋巴结非常困难。此外，分离过程中从肠系膜组织释放的脂肪能够大大减少细胞的获得，因为脂质对细胞具有毒性。脂肪组织通常是白色而且较大，而肠系膜淋巴结较黄且为椭圆形。

2. 用镊子从肠系膜上挑取可见的淋巴结。储存于无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的 HBSS 缓冲液中直至收集完全。将淋巴结放入 10cm 培养皿内并用手术刀切成小碎片，用注射器内芯沿逆时针方向旋转，轻轻地挤出细胞，用 50ml HBSS 缓冲液重悬细胞和组织碎片。
3. 首先通过 $100\mu m$ 然后是 $40\mu m$ 尼龙细胞滤器过滤细胞至一 50ml 锥形管内。取出一小部分计数（附录 3A）。4℃，450g 离心 10min 沉淀余下的细胞。用适当体积的缓冲液重悬 MLNC 细胞备用。

辅助方案 2　分离结肠炎小鼠的黏膜固有层细胞

LPMC 可直接用于体外刺激实验及其他细胞分离或 FACS 分析（第四章）。为防止降低细胞产量，在分离细胞时一个试管内不要合并超过来源于 5 个结肠的细胞。

其他材料（其他材料见辅助方案 1，带√项目见附录 1）

√HBSS/EDTA
含有 10%胎牛血清的 IMDM 培养基（IMDM-10）和 50mg/ml 庆大霉素
4000 Mandl 单位（3×10^6 Wunsch 单位）/ml 胶原酶 D（Roche）溶于 HBSS
1mg/ml DNase I（Roche）溶于 HBSS
√Percoll 液，70%和 30%
√无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} PBS 缓冲液

1. 纵向打开 TNBS 处理小鼠的腹腔。将膀胱和腹部脂肪推向旁边，鉴别腹膜后腔的直肠区，切下嵌入直肠的末端结肠并用镊子慢慢地从腹腔中取出。
2. 使用适当的手术器械仔细缓慢地将结肠与盲肠和阑尾分离。去除结肠外面所有的脂肪。重复步骤 1 和步骤 2 直到获得 5 个结肠。
3. 将结肠切成长 3cm 片段，然后沿纵向切割成 3cm×3cm 组织块。将它们放入一个 50ml 的锥形管并用 30ml 冷 HBSS 洗涤 3～5 次。让组织样品沉淀并用上清液排出结肠内容物。
4. 将组织碎片放入 20ml HBSS/EDTA 溶液中，37℃水浴孵育 30min，有规律地手动摇晃试管以确保彻底破坏黏膜上皮细胞。
5. 让碎片沉淀并弃去上清液。用 40ml HBSS 洗去存留的 EDTA。将碎片放入直径

10cm 的培养皿中，用刀片或手术刀尽可能切成足够小的片段。

6. 加入 5ml IMDM-10 及 50μg/ml 庆大霉素，用吸管吹打碎片，移至一新鲜的 50ml 锥形管内。添加含有添加物的 IMDM-10 至 20ml。加入 4000Mandl 单位/ml 胶原酶 D 1ml 和 1mg/ml DNase I 200μl，37℃水浴孵育 1h，有规律地手动摇晃试管。

   在细胞培养基中加入抗生素是必要的。由于依赖动物种群的不同，可能需要加入抗真菌药（如两性霉素 B；Life Technologies）以免培养液中有真菌生长。

7. 将上清液通过 100μm 尼龙细胞滤器过滤入一个洁净的 50ml 锥形管内。添加冷 HBSS 至 50ml，4℃，450*g* 离心 10min 以沉淀细胞，分散细胞并用 50ml HBSS 重悬。将上清液通过 40μm 尼龙细胞滤器过滤入另一个洁净的 50ml 锥形管内并沉淀细胞。

8. 分散细胞并用 20ml Percoll 液（30%）重悬细胞。在 50ml 锥形管内小心地铺上 25ml Percoll 液（70%）。室温，1100g（用 Sorvall H2000 转头，2200r/min）梯度离心 20min，使用尽可能小的加速和减速。用 PBS 洗涤细胞两次。取出部分细胞计数（附录 3A）。

   上皮细胞漂浮于 Percoll 液（30%）层，而淋巴细胞存在于 Percoll 液（30%）和 Percoll 液（70%）层之间。碎片和死细胞沉于管底。

参考文献：Fuss *et al.*，1996

撰 稿 人：Frank Scheiffele and Ivan J. Fuss

单元 10.11　系统性红斑狼疮动物模型

皮肤、关节、肾脏、中枢神经系统及其他部位的炎性损害是人类系统性红斑狼疮的特征。临床表现伴随着多种针对主要来源于细胞核的自身抗原的抗体。尽管由细胞介导的直接免疫损伤也是非常重要的，普遍认为是自身抗体导致了大部分的组织损害。

选择 SLE 动物模型

对于直接的药物疗法或单克隆抗体治疗，NZB/NZW 杂合小鼠或与之非常类似的 NZB/SWR 小鼠可能是最好的。它们发病与人类 SLE 相似而且也不像 MRL/lpr 小鼠会出现严重的淋巴结病那样复杂。MRL/lpr 小鼠发病迅速，如果这些模型中血管炎是非常重要的则可优先选择 MRL/lpr 小鼠。为了培育其他基因的自身免疫病品系，应当考虑选择 B6/lpr 或 B6/gld 小鼠。尽管这些动物会出现轻度自身免疫性疾病（出现抗染色质抗体，抗 DNA 抗体及 IgG），它们的 B6 背景使之易于饲养，可以利用 B6 遗传背景繁殖许多其他基因型确定的小鼠。利用辅助方案 3 中的 PCR 流程可制造它们与 lpr 和 gld 基因型杂交后代。另外，使用 B6/lpr 小鼠可用于许多 B6 同类系和基因敲除品系小鼠来进行细胞转移研究。

评估小鼠自身免疫性疾病的实验选择

上面提及的所有 SLE 模型都能够产生针对染色质和 ssDNA 的抗体。染色质的特异性非常有用，制备含有 DNA、组蛋白及多种核蛋白，使之成为全身性自身免疫病良好

的筛选试验。抗 dsDNA 抗体仅见于 NZB/NZW、NZB/SWR 及 MRL/lpr 小鼠，类风湿因子可见于 MRL/lpr 和 B6/lpr 小鼠。除了这些血清学指标外，蛋白尿、肾脏组织学及死亡率都是评估疾病非常有用的指标。

基本方案 1　ELISA 检测小鼠血清中抗染色质抗体

材料（带√项目见附录 1）

3μg/ml 鸡染色质原液（见辅助方案 1）溶于 PBS
√BBS，pH8.4
√BBT（含 BSA 和 Tween 的 BBS）
√抗核染色质对照血清，高滴度
待测抗染色质抗体血清样品
√BBS-T（含 Tween 的 BBS）
生物素标记山羊抗小鼠 IgG，Fcγ 片段特异性（IgG Fcγ-BNHS），牛血清蛋白（Jackson ImmunoResearch）
亲和素-碱性磷酸酶结合物（Sigma）
碱性磷酸酶底物（*p*-硝基苯磷酸盐，二钠，六水；Sigma 104 brand）
√0.01mol/L 二乙醇胺，pH9.8
平底 PVC 微孔板（Dynex Technologies）
酶标仪，最好是计算机界面及双波长（如 Molecular Device 公司的 Emax），或分光光度计

1. 根据待测样品，制作标准曲线样品及空白对照，铺板，复孔（见单元 1.1 中 ELISA 基本技术）。为有效地控制特异性，应当包括另外的阳性和阴性血清。
2. 用蒸馏水洗孔并于室温晾干。每孔中加入 3μg/ml 染色质原液 100μl，4℃孵育过夜包被板。
3. 每孔加入 200μl BBS 洗板 5 次。每孔加入 200μl BBT 封闭，然后室温孵育 2h。

   如果没有自动洗板仪，可使用洗瓶将缓冲液充满孔手工洗涤，在水槽中轻轻摇动微孔板，在最后一次洗板时，将板用力拍在纸巾上以去除残留的缓冲液。
4. 用 BBT 缓冲液倍比稀释高滴度抗核染色质对照血清，制备足以制作标准曲线所需包括酶反应上限和下限的稀释度（12～16 倍稀释）。用 BBT 缓冲液适当稀释待测血清（需经预试验确定）。
5. 每孔用 200μl BBS 洗涤封闭板，共 5 次。将稀释的标准品或待测血清分别加入适当的孔中，每孔加入 100μl。
6. 每孔用 200μl BBS-T 洗涤，共 5 次。每孔加入 100μl 经 1∶2000 稀释的（或其他经预试验确定的稀释度）溶于 BBT 的生物素标记山羊抗小鼠 IgG Fcγ BNHS。室温孵育 2h。

   也可使用碱性磷酸酶或其他的直接标记的抗体。生物素-亲和素系统可以增加敏感性。当然也可以使用针对同种型而非 IgG，或针对轻链的特异性抗体来替代抗 Fc 抗体。

7. 每孔用 200μl BBS-T 洗涤，共 5 次。每孔加入 100μl 经 1∶8000 稀释的（或其他经预试验确定的稀释度）溶于 BBT 的亲和素-碱性磷酸酶结合物。室温孵育 2h。
8. 每孔用 200μl BBS-T 洗涤，共 5 次。制备 1mg/ml *p*-磷酸硝基苯溶于 0.01mol/L 二乙醇胺，pH9.8。每孔加入 100μl，37℃孵育。
9. 在孵育 1h、4h 和 20h（或其他合适的时间点），运用 ELISA 酶标仪读取每孔在 650nm 和 405nm 的光密度值，用 650nm 的光密度值减去 405nm 的光密度值，制作标准曲线并分析待测样品。如果待测样品落在标准曲线的线性范围以外，稀释样品并重复试验。

基本方案 2　单链和双链 DNA 抗体的检测

抗 DNA 抗体是小鼠 SLE 和人 SLE 的标志。其他炎症条件下也可检测到抗单链 DNA（ssDNA）抗体，但是抗双链 DNA（dsDNA）抗体却是 SLE 特异性的抗体。

材料（带√项目见附录 1）

1mg/ml 小牛胸腺 DNA（I 型，Sigma）溶于水（用于检测抗 ssDNA 抗体）
1mol/L NaOH
√硼酸缓冲生理盐水（BBS），pH8.4，预冷（用于 ssDNA）或高压灭菌（用于 dsDNA）
0.1% *m/V* 多聚赖氨酸（Sigma）
dsDNA 溶液（见辅助方案 2；抗 dsDNA 抗体的检测）
√抗核染色质对照血清，高滴度（抗 ssDNA 或抗 dsDNA）
待测血清样品

1. 根据待测样品，制作标准曲线样品及空白对照，铺板，复孔（见单元 1.1 中 ELISA 基本技术）。为有效地控制特异性，应当包括另外的阳性和阴性血清。

检测 ssDNA 抗体

2a. 用蒸馏水洗孔并于室温晾干。
3a. 将含有 1/10 体积 1mol/L NaOH 的 1mg/ml 小牛胸腺煮沸 10min 使之变性。立即置于冰上 10min。用预冷 BBS 稀释至 3μg/ml。

检测 dsDNA 抗体

2b. 用 0.01%多聚赖氨酸按 100μl/孔铺板，室温放置 1h。用蒸馏水洗涤 3 次并晾干（使用前可以储存 1 周）。
3b. 将 dsDNA 用室温的经高压灭菌的 BBS 稀释至 2.5μg/ml。
4. 将稀释的 ssDNA 或 dsDNA 按 100μl/孔加入 ELISA 微孔板并于 4℃孵育过夜以包被板。按以前描述的那样完成 ELISA 检测（见基本方案 1，步骤 3～9），用已知滴度的抗 ssDNA 抗体或抗 dsDNA 抗体对照血清制作标准曲线。

基本方案 3　ELISA 检测类风湿因子

除了特殊试剂需要改变以外，本 ELISA 操作与染色质抗体的检测一样。因为所识别的亚类和同种异型抗体存在种属依赖的偏选性（如 B6/lpr 小鼠偏向产生 IgG1 和 $IgG2^b$ 亚类抗体），因此需要预实验确定待测对象。基于此目的而应用的纯化的小鼠骨髓瘤蛋白或小鼠杂交瘤产生的 mAb 可以从许多供应商那里购买。为检测抗 $IgG1^a$ RF IgM，可以按照基本方案 1 操作并做出如下修改：

1. 包被微量板，用 BBS 配制 2μg/ml 小鼠 $IgG1^a$ 抗体（克隆 MOPC-31C，Sigma），100μl/孔包被板。也可以应用 $IgG1^a$ 的同种型 mAb 或纯化的小鼠 $IgG1^a$。
2. 检测标准品，用含有高滴度 RF 的对照血清作为标准品（操作指南见附录 1 中抗染色体对照血清）。
3. 检测 RF 时，用 1∶20 000 稀释的（或其他经预试验确定的稀释度）溶于 BBT 缓冲液的生物素标记驴抗小鼠 IgM $F(ab')_2$ 片段（μ 链特异性；Jackson ImmunoResearch），室温孵育 1h。

基本方案 4　ELISA 检测同种异型特异性抗体时标准曲线的制作

已知针对小鼠 Ig 重链恒定区的特异性同种异型抗体的特性并已经研制出同种异型特异性 ELISA。这项技术允许研究对不同的同种异型 B 细胞群体各自或联合产生的特异性抗体应答。已知大多数小鼠存在 *Igh-C* 基因单倍型。经常使用的 BALB/c 小鼠携带“a”单倍型（$Igh\text{-}C^a$）而 C. B-Igh-1^b/IcrTac 小鼠与 BALB/c 小鼠为同类系，最初由 Fox Chase Cancer Center 研制，从 Taconic Farms 可以购得。该小鼠携带来源于 C57BL/Ka 小鼠的 $Igh\text{-}C^b$ 单倍型。与此相类似，C57BL/6 小鼠携带 $Igh\text{-}C^b$ 单倍型而且为 B6. C20 同类系，也是由 Fox Chase Cancer Center 研制，携带 *Igh-C* 单倍型。$MRL/MpJ\text{-}Tnfrsf6^{lpr}$ 小鼠携带与“a”单倍型相似的 $Igh\text{-}C^j$ 单倍型，因此抗 a 特异性试剂也可使用。

同种异型特异性 ELISA 的关键是抗同种异型特异性和非特异性检测抗体的确认和准备。目前可以购买到这些抗体，大大地增加了这些检测方法的可行性（表 10. 11. 1）。

表 10. 11. 1　同种异型特异性试剂

试剂	特异性	制造商	编号
兔抗小鼠 $IgG2a^a$	$IgG2a^a$	Nordic	YNRMIgG2a1a
兔抗小鼠 $IgG2a^b$	$IgG2a^b$	Nordic	YNRMIgG2a1b
兔抗小鼠 IgG2a	IgG2a	Nordic	YNRMIGg2a
8. 3	$IgG2a^a$	BD PharMingen	05022D
5. 7	$IgG2a^b$	BD PharMingen	05032D
R19-15	IgG2a	BD PharMingen	02012D
DS-1	IgM^a	BD PharMingen	05092D
AF6-78	IgM^b	BD PharMingen	05102D
R6-60. 2	IgM	BD PharMingen	02082D

所有的试剂必须在各个研究者的实验条件下检测，而且为了增加 ELISA 不同的特异性还需要一些另外的步骤。类似地，也需要一批已知浓度的纯化的同种异型小鼠骨髓瘤蛋白或 mAb 作为标准品。使用以前，应当仔细地确定这些标准品的浓度。可以通过分光光度计检测 OD_{280}（表 1.5.2 列出了 Ig 的吸光系数），或通过更严格的实验方法(Bio-Rad)。Pharmingen 公司可以提供“a”和“b”同种异型 IgM 和 IgG2a mAb。

同种异型特异性 ELISA 的用途主要在于能够检测出一种同种异型，即使存在另外的同种异型，这种区分可用于研究由于骨髓嵌合体混合引起两种不同的试验结果或进行相关的试验设计。在一种试验中，需要查明即便在另外一种同种异型抗体存在的情况下一种同种异型抗体的存在与否。在另一种试验中，研究者也许想要定量两种同种异型抗体的相对数量。这两种实验都需要最小化交叉反应，为了进行半定量比较相同的血清标本中两种同种异型抗体，要求仔细滴定所应用的同种异型特异性检测试剂。应用这种检测方法确定抗体水平时这种要求更为严格，因为不可能精确的定量检测两种适合比较的样品中抗体的实际水平。为达到这个目的，有必要使用同种异型非特异性试剂作为同种异型特异性试剂的参照。同种异型非特异性试剂兔抗小鼠 $IgG2a^{a/b}$ 可作为同种异型特异性试剂兔抗小鼠 $IgG2a^{a}$ 和 $IgG2a^{b}$ 的参照。因为这些试剂的检测能力在摩尔水平上没有可比性，因此，需要将同种异型特异性和非特异性试剂与相同的对照 mAb 进行平行比较，从而建立所用检测试剂的滴度，也需要调节所用每一种试剂的数量，使它们产生重叠的滴度曲线（图 10.11.1）。例如，抗“a”试剂，需要将非同种异型试剂和非特异性试剂和已知浓度的相同对照 $IgG2^{a}$ mAb 进行比较，并且需要调节试剂数量以便产生重叠的滴度曲线。对 b 特异性试剂也是如此，不过需要调节它们的数量使之产生与 a 特异性试剂相重叠的滴度曲线。通过调节每一种同种异型特异性试剂与所参照的同种异型非特异性试剂的数量，检测抗体的数量也得以调节，得到在曲线的线性范围以内具有可比性的 OD 值，表明两种同种异型抗体具有可比性的活性。图 10.11.1 显示这样调节数量的结果。图中曲线为 OD 值与标准同种异型抗体浓度之间的对应关系。曲线＃1 和曲线＃2 为 $IgG2^{a}$ mAb 对应于抗 $IgG2a^{a}$ 同种异型特异性试剂和同种异型非特异性抗 $IgG2^{a/b}$ 试剂。曲线＃3 和曲线＃4 为 b 同种异型。

欲使实验成功，所用检测试剂必须确实为同种异型特异性的，非特异性的干扰必须降至最低。使用商业来源的试剂能够达到目的，但是在某些特殊的试验中，这两种试剂中的一种或两种都会出现一些不必要的交叉反应。这种交叉反应可由很多原因引起，通过严格的洗涤或缩短孵育时间都不能解决问题。解决这个问题最好的方法是使用血清交联的 Sepharose 磁珠去吸收那些不必要的反应。也可以使用与检测抗体同种的俘获抗体。有时候，检测抗体必须用交联俘获抗体的 Sepharose 磁珠进行吸收。为确定个别试剂的交叉反应及由此引起的预吸收，必须同时检测同种异型特异性试剂与同种异型特异性和非特异性试剂之间的反应。检测 RF（见基本方案 3）也许需要使用俘获抗体 $F(ab')_2$。

附加材料（其他材料见基本方案 1）

1μg/ml 驴抗小鼠 IgG $F(ab')_2$ 片段（Jackson ImmunoResearch）

mAb 标准品：小鼠 mAb $IgG2a^{a}$（克隆号 G155-178，Pharmingen）或

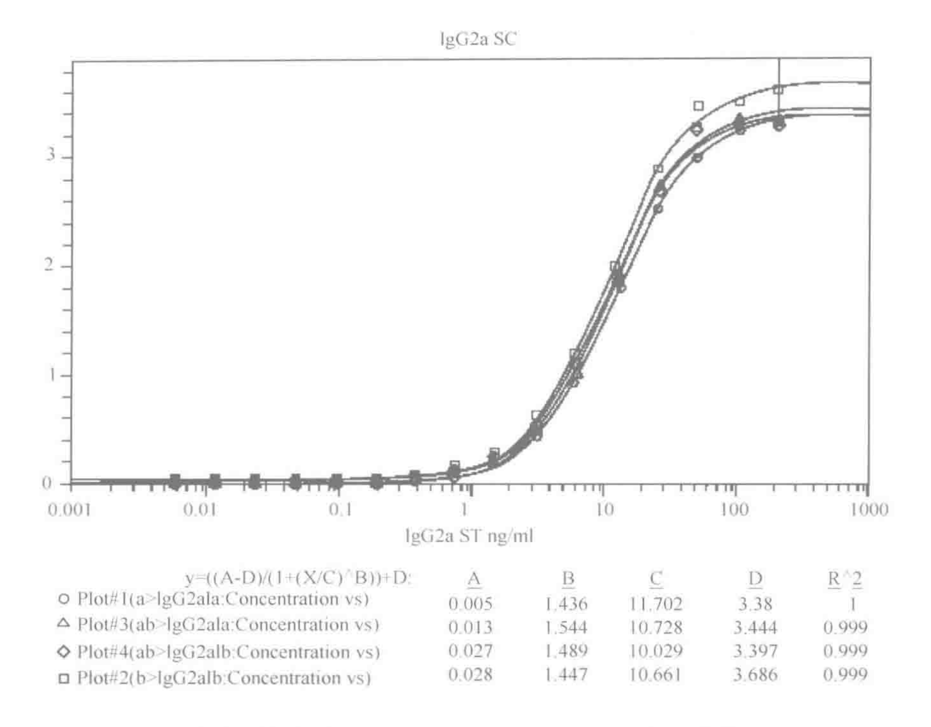


图 10.11.1　IgG2a 同种异型特异性 ELISA 标准曲线。

小鼠 mAb IgG2a^b（克隆号 C76-47，Pharmingen）

兔抗小鼠 IgG2a、IgG2a^{a}和 IgG2a^b（Nordic Immunological Laboratories）

AKP 标记驴抗兔 IgG F（ab$'$）$_2$片段（H+L；Jackson ImmunoResearch）

1. 准备两块微量板：一块用于“a”同种异型标准品；另一块用于“b”同种异型标准品。标记每一块能够得到三条标准曲线的孔，分别为抗“a”抗体，抗“b”抗体和非同种异型检测抗体，每一种均从 200ng/ml 开始进行系列稀释。还应该包括空白对照。见单元 1.1 ELISA 检测基本技术。
2. 用蒸馏水洗孔并于室温晾干。每孔中加入 1μg/ml 驴抗小鼠 IgG F（ab$'$）$_2$ 100μl，4℃孵育过夜，包被微量板。
3. 用 200μl/孔 BBS 洗涤板，共 5 次。加入 200μl/孔 BBT 封闭液，室温孵育 2h。

   如果没有自动洗板仪，可使用洗瓶将缓冲液充满孔手工洗涤，在水槽中轻轻摇动微孔板，在最后一次洗板时，将板用力拍在纸巾上以去除残留的缓冲液。
4. 用 BBT 缓冲液将标准的 mAb（IgG2a^{a}或 IgG2a^b）从 200ng/ml 开始进行倍比系列稀释，包括 10～12 个稀释度（稀释的程度应当包括酶促反应的上限和下限）。
5. 用 200μl/孔 BBS 洗涤封闭过的微量板，共 5 次。在适当的孔中加入 100μl/孔稀释后的标准品。4℃孵育过夜。
6. 用 200μl/孔 BBS-T 洗涤微量板，共 5 次。每孔分别加入 100μl 经 1∶20 000 稀释的溶于 BBT 的兔抗小鼠 IgG2a、兔抗小鼠 IgG2a^{a}和兔抗小鼠 IgG2a^b。室温孵育 2h。

   稀释度可以有所变化，但是须在 1∶10 000～1∶40 000。
7. 用 200μl/孔 BBS-T 洗涤微量板，共 5 次。每孔分别加入 100μl 经 1∶15 000 稀释于

BBT 的 AKP 标记驴抗兔 IgG F（ab′)$_2$（H+L）。室温孵育 2h。

稀释度可以有变化，应当经过预试验确定。

8. 进行 AKP 底物反应并分析结果（见基本方案 1，步骤 8 和步骤 9）。

备选方案　ELISPOT 检测抗染色质抗体形成细胞

ELISPOT 检测（单元 8.11）用于定量测定抗体分泌细胞的活性，这些细胞或直接从自身免疫性动物中分离或体外培养。

材料（带√项目见附录 1）

鸡染色质（见辅助方案 1）

√PBS

小鼠脾细胞单细胞悬液（单元 2.1）或其他用于检测产生抗体的细胞（如抗染色质杂交瘤细胞和非自身免疫细胞）

√完全 RPMI-10

封闭缓冲液：5g 脱脂奶粉溶于 100ml PBS

AKP 标记抗小鼠 κ 抗体（Southern Biotech）

酶底物溶液（BCIP/NBT）：用 10ml 蒸馏水溶解 Sigma Fast tablet（Sigma），放置 1h，必要时用 0.22μm 滤膜过滤

MultiScreen-IP 板（Millipore）

多道移液器

注意：接触细胞的所有液体和器材必须无菌，因此需要相应的无菌操作。

注意：除非特别说明，所有的培养需在 37℃，5% CO_2 培养箱内进行。

1. 与所有此类实验一样，板中加样孔的设计十分重要。根据预实验确定每一种样品最适的浓度范围（例如，进行 10^5、10^6、10^7 系列稀释）。样品三复孔，还应当含有阳性和阴性对照。前者为一种抗染色质分泌杂交瘤如 2B1 或 81.5。后者为来源于无自身免疫性疾病小鼠的细胞。不加靶抗原或细胞的孔为另外的对照。
2. 用 PBS 调节鸡染色质浓度为 10mg/ml，以 100μl/孔加入 MultiScreen-IP 板中，4℃孵育过夜。
3. 制备单个脾细胞悬液（见单元 2.1）或其他以用于检测抗体形成细胞，置于冰上。用 RPMI-10 调节脾细胞悬液至合适的浓度（通常离体培养的脾细胞浓度为 10^5～10^7 个细胞/ml，杂交瘤细胞浓度为 10^3～10^4 个细胞/ml）。
4. 用 PBS 洗板 5 次，在一个大容器上轻弹并在纸巾上面拍干，使用多道移液器加入 PBS 并注意不要戳破板底的膜。每孔加入 200μl RPMI-10，室温孵育 5min。弃去培养基并在纸巾上面拍干。
5. 在各孔中加入 100μl 细胞悬液，37℃，5% CO_2 孵育 2h。吸弃细胞悬液，如步骤 4 一样用 PBS 洗板 5 次。
6. 每孔加入 200μl 新鲜制备封闭缓冲液，室温孵育 1h，如步骤 4 一样用 PBS 洗板 5 次。
7. 每孔加入 100μl 经 1∶10 000 稀释的 AKP 标记的抗小鼠抗体，37℃孵育 1h。如步骤 4 一样用 PBS 洗板 5 次。

8. 每孔加入 100μl 酶底物溶液，室温孵育 1h。用步骤 4 中所述技术用水洗板终止显色反应。
9. 将板风干并计数蓝斑，最好使用解剖显微镜。记录每孔中抗体分泌细胞的数目。

辅助方案 1　低渗裂解鸡红细胞核制备鸡染色质

材料（带√项目见附录 1）

鸡血 Alsever 溶液（来源于当地供应商或 Colorado 血清公司；http://www.colo-rado-strum.com）

√0.1mol/L EDTA

缓冲液 A：0.08mol/L NaCl/0.02mol/L EDTA，pH7.5

缓冲液 A 中加 1.5%（*V/V*）Triton X-100

1.7mol/L 和 2.25mol/L 蔗糖（梯度级）溶于缓冲液 A

√50mmol/L Tris-Cl，pH7.9（附录 2A）

50ml 离心管

超声破碎器（普通通用型）

25mm×89mm 超速离心管（Beckman）

1. 将鸡血储存于 Alsever 溶液中备用。将 200ml 鸡血分在四只试管中。室温，1800*g* 离心 10min，弃去上清液并用缓冲液 A 洗涤两次。分别在四只试管中加入 23ml 缓冲液 A 重悬细胞并加入 23ml 1.5% Triton X-100 裂解细胞。
2. 准备两只 25mm×89mm 的预冷的不连续蔗糖梯度超速离心管，管底为 2ml 溶于缓冲液 A 的 2.25mol/L 蔗糖，其上为 18ml 溶于缓冲液 A 的 1.7mol/L 蔗糖。将来源于步骤 1 的 15ml 裂解液仔细铺于最上层。

   每一管将由三层组成，共计 35ml。
3. 4℃，113 000*g*（25 000r/min，SW-27 转头）超速离心 90min。移弃蔗糖溶液，用金属刮勺和纸巾将管壁残留的蔗糖溶液擦去。
4. 用去掉末端的 1ml 蓝色吸头和 20ml 缓冲液 A 非常温和的重悬沉淀。4℃，2000*g* 离心 15min。弃去上清液并用 15ml 50mmol/L Tris-Cl（pH7.9）重悬沉淀。重复离心，弃去上清液，再次用 15ml 50mmol/L Tris-Cl（pH7.9）重悬沉淀。重复离心并弃去上清液。用 15ml 预冷的蒸馏水重悬沉淀。4℃超声破碎沉淀物。不要超过 6 次。
5. 彻底超声破碎后，测量 260nm 吸光度。按照公式 1mg/ml DNA＝20 OD_{260} 计算出 DNA 的浓度并按照公式 1mg/ml 染色质＝（OD_{260}×稀释度）/20 计算出染色质的浓度。用 0.1mmol/L EDTA 稀释至 1mg/ml；分装并于－70℃冻存。

   用于 ELISA 检测时染色质的常用浓度为 3μg/ml，可以不定量的在－70℃下冻存。一旦融化后，加入终浓度为 0.1%的叠氮钠置 4℃储存。

辅助方案 2　dsDNA 的制备

材料（带√项目见附录 1）

小牛胸腺 DNA，I 型（Sigma）

√20×SSC，无菌

24∶1（V/V）氯仿∶异戊醇

95%乙醇，−20℃

√0.1mol/L 乙酸缓冲液，pH5

0.1mol/L $ZnCl_2$

15 000U/ml 核酸酶 S1（Amersham Biosciences）

250ml 离心管（Corning）

台式离心机

透析袋（MWCO 3500）

1. 在 250ml 离心管内用 250ml 0.1×SSC 溶解 500mg DNA，4℃静置过夜。通过加入 20×SSC 直至浓度达到 1×SSC 并转移 125ml 至另外一只 250ml 离心管内。
2. 每管加入等体积 24∶1 氯仿/异戊醇（现在每管含有 125ml），室温振荡 45min，然后静置 15min。室温，1140*g* 离心 10min。将每管中的上相转移至新的试管内。重复步骤 3 和步骤 4，共计 5 次，直到交界面无可见的碎片。每管加入 2∶1 体积−20℃的 95%乙醇。
3. 通过快速转动一个玻璃巴斯德吸管缠绕 DNA，转移至一个新的含有 200ml 0.1×SSC 的试管内，再次溶解 DNA，4℃过夜（或 56℃，2h）。加入 20×SSC 直至浓度达到 1×SSC。分装，−20℃储存或直接进行核酸酶消化（步骤 4）。
4. 使用 MWCO 3500 透析袋，用 1L 0.1mol/L 乙酸缓冲液对来源于步骤 3 的 10ml DNA 溶液进行透析，4℃过夜。在 10ml 透析后 DNA 溶液中按 1μg DNA 加入 100μl 0.1mol/L $ZnCl_2$ 及 1U 核酸酶 S1。37℃孵育 45min。
5. 加入 2.5 倍体积−20℃ 95%乙醇（约 25ml）。用一个玻璃巴斯德吸管缠绕 DNA。像步骤 3 那样再将 DNA 溶于 0.1×SSC。当 DNA 溶化后通过加入 20×SSC 调节浓度至 1×SSC。测量 OD_{260} 和 OD_{280} 以确定 DNA 的纯度和浓度也许还需要另外的氯仿/异戊醇抽提。

辅助方案 3　基于 PCR 技术的 fas^{lpr}突变体和 $fasL^{gld}$突变体的基因分型

产生 Fas 的 fas^{lpr}突变体或 FasL 的 $fasL^{gld}$突变体的小鼠已广泛用于研究狼疮样系统性自身免疫的自发性模型。

fas^{lpr} 基因分型 PCR

以下的 PCR 方案可用于区分野生型 MRL/MpJ 小鼠和 *fas*（*tnfrsf6*，CD95）基因突变型 *fas*^{lpr} 小鼠。本方案使用能够鉴别相同反应样品中任一等位基因的三引物设计策略。

fas 和 *fas*^{lpr} 基因的寡核苷酸引物是基于已公布的插入 MRL*lpr* 小鼠 *fas* 基因内含子 II 的早期转座子（ETn）的核苷酸序列而设计的。引物分别位于 ETn 插入位点 5′端，ETn 插入位点 3′端，以及 ETn 的 5′端（图 10.11.2A）。共同的 5′端引物与两个 3′端引物配对能够产生各自独立的条带。

引物序列为：

FAS：5′-CAA GCC GTG CCC TAG GAA ACA CAG

FAS：3′-GCA GAG ATG CTA AGC AGC AGC CGG

ETN：3′-GTG GAG CTC CAA TGC AGC GTT CCT

任何来源的基因组 DNA（如尾、血液、耳）均可用于基因分型。

在标准条件下（1.0mmol/L $MgCl_2$）用 1.25U *Taq* DNA 聚合酶于 50μl PCR 反应体系中进行 PCR 扩增。扩增参数 94℃、30s（解链），55℃、30s（复性），72℃、30s（延伸），共计 30 个循环。用 1%琼脂糖凝胶分离 PCR 产物，并用溴化乙锭染色观察。应用以上三个引物能分别扩增出长 240bp 的野生型 *fas* 基因及长 445bp 的 *lpr* 突变体基因。

$fasL^{gld}$ 基因分型 PCR

下面的 PCR 方案利用不同的策略以区分来源于 C3H/HeJ 小鼠的 *fas* 配体（*tnfsf6*、*fasL*、CD178）的野生型和自发性突变型基因。$fasL^{gld}$ 突变体为 *fasL* 基因第四外显子编码区的点突变（279 位 T 突变为 C；Lynch *et al*.，1994；Takahashi *et al*.，1994）。放大受阻突变体系（ARMS）被用于设计能够区别两个等位基因的四条引物。ARMS 利用了 *Taq* DNA 聚合酶缺乏核酸外切校正活性。位于多态位点 3′端的一条引物能够通过在一个或多个核苷酸错配时阻止继续向前扩增来区分这些多态性。通过设计等位基因特异性的 PCR 引物，即可使用两套引物通过对每一只小鼠的单次反应以区分各自的等位基因（图 10.11.2B；Suda *et al*.，1993；Takahashi *et al*.，1994）。为鉴定野生型 *fasL* 基因，5′端引物（5FASL）位于第四外显子编码区内侧的点突变处（图 10.11.2B 星号），而下游的 3′端引物（3FASL）则位于第四外显子的非编码区。为鉴别 *gld* 等位基因，5′端引物（5GLD）位于第四外显子编码区内而 3′端引物（3GLD）则位于点突变的末端。在 5FASL 和 3GLD 最后一个碱基之前都添加了一个错配核苷酸以增加特异性。引物序列为：

野生型 *fasL* 引物对：

5FASL：CTC TGA TCA ATT TTG AGG AAT CTA AGA CGT

3FASL：CTC TTG GCC ATT TAA CAT CAG ACA GTT CTT

$fasL^{gld}$ 引物对：

5GLD：TTT CTT TTA AAG CTT ATA CAA GCC GAA ACG

3GLD：CTA TAT GAG GAA CTC TAA GTA TCC TGA GGA

任何来源的基因组 DNA（如尾巴、血液、耳朵）均可用于基因分型。

在标准条件下（2.0mmol/L $MgCl_2$）用 1.25U *Taq* DNA 聚合酶（Applied Biosystems）于 50μl PCR 反应体系中扩增 1μg 基因组 DNA。四条引物浓度分别为：5FASL，3μmol/L；3FASL，1μmol/L；5GLD，1μmol/L 及 3GLD，3μmol/L。扩增参数 92℃、30s，60℃、60s，72℃、45s，共计 36 个循环。用 1%琼脂糖凝胶分离 PCR 产物，并用溴化乙锭染色观察。该四引物 PCR 的产物为长 350bp 的野生型 *fasL* 基因及长 220bp 的 *gld* 突变体基因。

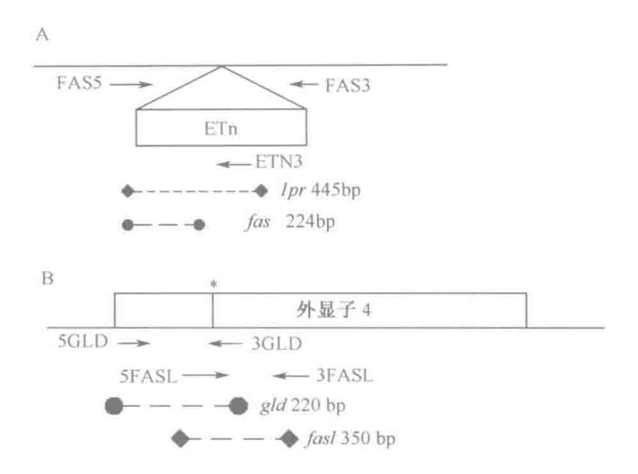


图 10.11.2　检测 fas^{lpr} 突变体（A）和 $fasL^{gld}$ 突变体（B）PCR 引物的位置。

参考文献：Cohen and Eisenberg，1992

撰 稿 人：Philip L. Cohen and Milchael A. Maldonado

［韩德平（第十章）］

第十一章 传染性疾病动物模型

很多传染性病原体表现出明显的宿主特异性，仅能引起相关物种的疾病，但建立动物模型仍是近似模仿人类传染病致病过程的有效手段。本章的许多实验方案需要特殊的、处理感染和免疫应答动物的条件，并需要特别注意对不同病原体感染动物的饲养和管理。必须小心避免同一种系动物中感染与非感染动物间的交叉感染。此外，由于一些传染源是人类病原体，实验人员及动物饲养人员需具备特定的灭菌处理技术。

单元 11.1 介绍了建立利什曼原虫感染小鼠模型的方法。BALB/c 小鼠在感染利什曼原虫后由于 IFN-γ 缺失和IL-4表达的增高，表现出明显的 Th2 反应，并可导致严重的疾病（如果感染不控制可由体表扩散至体内，具有致死性）。单元 11.2 介绍的弓形虫感染小鼠模型中，$CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞是抗感染的基础，$CD8^+$ 细胞通过分泌 IFN-γ 启动抗感染作用。单元 11.3 介绍巨细胞病毒（CMV）感染小鼠模型的建立，由于 CMV 病毒有严格的种属特异性，该小鼠模型只能用小鼠 CMV 感染，而不能用人源 CMV 感染小鼠。单元 11.4 介绍了单核细胞增生性利斯特氏菌属感染小鼠的方法。单元 11.5 介绍了用淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒诱导小鼠全身性感染的方法。单元 11.6 中介绍引起人类高发病率、高死亡率的病毒（如流感病毒）。

从临床和实验的角度看，感染性动物疾病模型最重要的应用是进行合理的疫苗设计，而接种疫苗仍然是广为人知、最有效果和成功地用免疫学保护人类健康的方法。本章介绍的多种动物模型可应用于传统的热灭活或减毒疫苗及亚单位疫苗、DNA 疫苗的临床前评估。

撰 稿 人：Ethan M. Shevach

单元 11.1 利什曼原虫感染的小鼠模型

此模型已被很多实验室用以分析机体对利什曼原虫的易感性和抗感染的免疫机制。

利什曼原虫的生命周期（图 11.1.1）包括两个阶段，每个阶段都能很好的适应在哺乳动物宿主内的生存，并引发感染。

注意：利什曼原虫对人具有中度潜在危害，因此在进行寄生虫操作时，须应用生物安全 2 级防护（见前言）。据报道，实验室感染时有发生，最大的危险在于接种实验动物。实验室人员处理病原菌必须经过相关的专业培训。

基本方案 皮肤利什曼原虫病小鼠模型

皮肤利什曼原虫病实验模型分别使用遗传易感的和有抵抗力的近交系小鼠（表 11.1.1）。

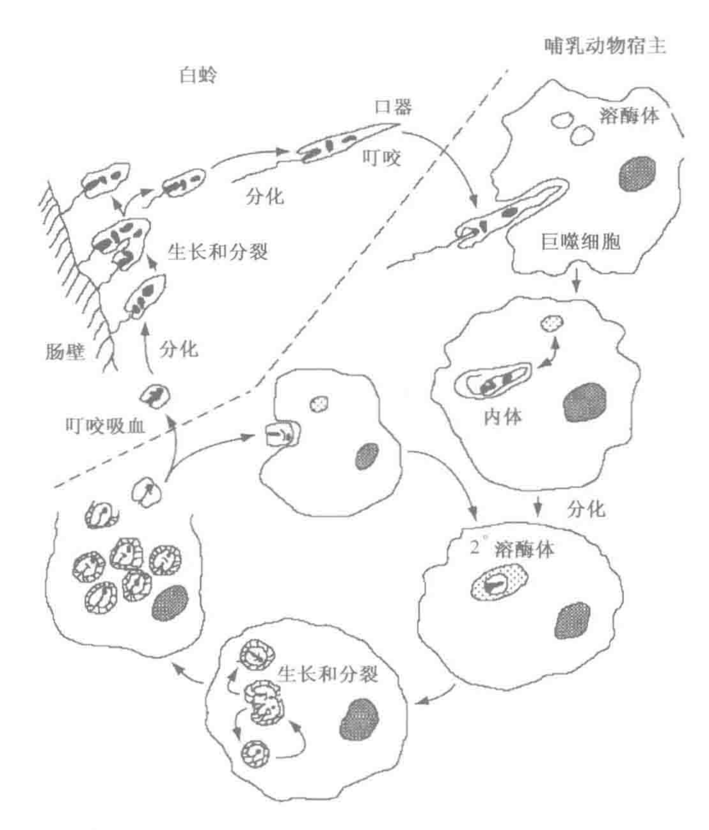


图 11.1.1 利什曼原虫的生命周期，显示前鞭毛体在白蛉消化道内的生长发育。后发育期的前鞭毛体接种于哺乳动物宿主皮肤，被巨噬细胞摄取，在吞噬体内转化成为无鞭毛体并复制，裂解巨噬细胞后可侵入其他巨噬细胞，或通过叮咬进入白蛉体内转化回前鞭毛体。

表 11.1.1 所选择的近交系小鼠皮肤或内脏感染利什曼原虫菌株后的结果

Host[a]	*L. major*[b]	*L. mexicana*[b]	*L. braziliensis*[b]	*L. donovani*[c]
BALB/c	递进	递进	无损伤	急性易感/未治疗
DBA/1	慢性	ND	ND	急性易感
DBA/2	慢性	无损伤	ND	急性抵抗
CBA	痊愈	ND	ND	急性抵抗
C3H	痊愈	痊愈	ND	急性抵抗
A/J	痊愈	痊愈	ND	急性抵抗
AKR	痊愈	ND	ND	急性抵抗
NZB	痊愈	ND	ND	急性抵抗
C57BL	痊愈	慢性	ND	急性易感/治愈

a. 小鼠通常不是 *Viannia* 亚属致病宿主（*L. braziliensis*，*L. panamensis*，*L. guyanensis*），而 *Viannia* 亚属在美洲与大多数皮肤和黏膜疾病有关系。

b. 表皮和真皮下感染 10^4～10^7 浓度的寄生虫。ND，未知。

c. 静脉内感染 10^6～10^7 寄生虫。

材料（带√项目见附录1）

寄生虫接种物，无鞭毛体或后发育期前鞭毛体（见辅助方案1～3）
DMEM或HBSS（附录1），不加$CaCl_2$或$MgCl_2$
小鼠（表11.1.1）
√199完全培养基（C-M199）
测径器（游标，标度盘或数字的）
1.5ml Eppendorf离心管（高压灭菌，提前称重）
1.5ml微量离心管研磨棒（聚丙烯，一次性，灭菌）
血液琼脂培养皿（见辅助方案4）
26℃，无CO_2培养箱

1. 将寄生虫接种物溶解于DMEM或HBSS中，配成所需浓度（10^5～10^7）至40～50μl。

除了遗传背景外，小鼠模型的疾病过程及结果可受寄生虫剂量、接种途径及部位、寄生虫致病力的种内差异等影响。需用特定期的寄生虫感染，以比较体内致病力。

2. 浅麻醉（附录2D）或将小鼠固定（附录2C）后，足垫注射含有寄生虫的悬液（附录2E）。
3. 每周或定时观察足垫肿胀情况。固定动物（不麻醉），用测径器在第五趾尖底部测量足垫宽度和厚度，以未接种足垫作为对照。结果为足垫厚度、宽度的增加值（或评分），以mm^2表示。

4a. 淋巴结或脾脏：接种侧腹股沟引流淋巴结或脾脏制作成单细胞悬液后（单元2.1）重悬于10ml C-M199中。

4b. 足垫：表面消毒感染足垫后解剖（见辅助方案2），取下1～10mg组织放入灭菌、提前称重的含有0.3ml C-M199的Eppendorf管内，盖上盖子后翻转或轻敲管子使组织沉于底部，不使组织脱水。称重离心管后研磨组织。

避免手术刀或剪刀同组织一起浸入培养基，这样会带走一定体积的溶液，造成组织称重不准确。

5. 取100μl组织匀浆（或脾脏或淋巴结悬液）和相同体积的C-M199，进行倍比稀释，接种至灭菌的血液琼脂培养板中。密封培养皿，26℃，无CO_2条件下培养7～10d。

倍比稀释可在96孔板上进行，然后转移至适当的血液琼脂培养皿内。

6. 倒置显微镜下计数前鞭毛体。如果血琼脂板影响直接观察，可取少量液体于载玻片或96孔板上进行计数。计算整个淋巴结或脾脏寄生虫数量，也可计算每毫克足垫组织的寄生虫数量，即寄生虫可生长的最高稀释度/组织重量。

辅助方案1　使用花生凝集素制备后发育期前鞭毛体

后发育期的前鞭毛体体外生长在种系之间明显不同，即使在同一品系内，也可受传代培养的次数及生长条件的影响。因此，动物感染所需的前鞭毛体接种物应尽可能通过纯化后发育期前鞭毛体而标准化。在*L. major*和*L. donovani*的固定培养物中，由于后

发育期前鞭毛体不被花生凝集素凝集，因此可用于鉴别和纯化后发育期前鞭毛体。

材料（带√项目见附录 1）

寄生虫：新鲜分离或冷藏的 *L. major* 或 *L. donovani* 稳定的无鞭毛体（见辅助方案 2 和 3）或早期前鞭毛体（ATCC；见辅助方案 3）

√199 完全培养基（C-M199）

DMEM 或 HBSS（附录 1），不加 $CaCl_2$ 或 $MgCl_2$

5～10mg/ml 花生凝集素（PNA；Vector Lab 公司）

25cm² 组织培养皿

75cm² 或 225cm² 组织培养皿（任选）

26℃，无 CO_2 培养箱

1. 在 25cm² 培养瓶中加入 10ml 的 C-M199，接种 0.5×10^7～1×10^7 寄生虫，26℃，培养 6d。
2. 可选：根据所需后发育期寄生虫的数量，将上述 10ml 已处于对数生长的寄生虫接种到含 50～100ml C-M199 的 75cm² 或 225cm² 组织培养瓶中，扩增培养 1～2d。
3. 在装有 50ml DMEM 或 HBSS 的 50ml 离心管中 4℃，3000*g* 离心 15min，洗涤两次。重悬于 DMEM 或 HBSS 中并计数，加少量 20%（*V/V*）丙三醇用于保存活力，配成 1×10^8～2×10^8 个细胞/ml。
4. 加 0.01 体积的 5～10mg/ml 花生凝集素（终浓度 50～100μg/ml）。室温培养 15～30min。4℃，200*g* 离心 5min。收集上清后按步骤 3 洗涤两次。
5. 以少量体积 DMEM 或 HBSS 重悬细胞，计数后配成合适浓度以供培养。

辅助方案 2　从足垫组织中纯化无鞭毛体

为了避免前鞭毛体异质性的问题，可以通过接种从感染组织中纯化的无鞭毛体组分。

材料

BALB/c 小鼠，足垫无溃疡性损伤（见基本方案）

1.75%（*V/V*）碘溶液（碘附，Amsco）

70%（*V/V*）乙醇

PBS（附录 1）包含 2mmol/L EDTA 和 50mmol/L 葡萄糖

DMEM 培养基或 HBSS（附录 1），不加 $CaCl_2$ 或 $MgCl_2$

5mg/ml 二乙酸荧光素（FDA；Sigma）丙酮液（4℃稳定 6 个月）

20μg/ml 碘化丙啶（PI；Sigma）PBS 液（4℃稳定 6 个月）

研钵

灭菌的玻璃纤维

1. 感染后 4～6 周，在形成溃疡前，脱颈处死 BALB/c 小鼠。表面消毒足垫，浸泡足垫于 1.75%碘溶液 10min，然后浸泡足垫于 70%乙醇 10min，蒸馏水清洗。

从感染了表皮种属的无鞭毛体包括 *L. major*、*L. mexicana*、*L. amazonensis* 和

某些种类的 *L. braziliensis* 的 BALB/c 小鼠的一个足垫可收集到大量的无鞭毛体（近 10^8）。

2. 分离皮肤和皮下损伤组织，用无菌手术刀或剪刀切除主要损伤组织。
3. 在盛有小量（3～5ml）含 2mmol/L EDTA 和 50mmol/L 葡萄糖的 PBS 的研钵中轻轻研磨感染组织。在显微镜下观察组织匀浆是否大多数宿主细胞破裂。
4. 用装有少量无菌玻璃尼绒毛的 5ml 注射器过滤所得悬液。
5. 4℃，200*g* 离心 10min 去除细胞碎片。重悬无鞭毛体于 50ml DMEM 或 HBSS 中，4℃，3000*g* 离心 15min 后，沉淀物用少量 DMEM 或 HBSS（1～5ml）重悬。
6. 将 5mg/ml 的 FDA 液 0.04ml 加入到 10ml 的 PBS 中，制备新鲜 FDA 工作液。将 0.1ml FDA 工作液（最终 2μg）和 0.03ml 的 20μg/ml 的 PI（0.6μg）直接加至 0.1～1.0ml 细胞中。细胞染色 3min 后置于白细胞计数器中。用倒置荧光显微镜检测，交替使用绿色（可见光）和红色（不可见光）过滤片观察和计数标记细胞。
7. 调整浓度用于接种或冷冻保存（见辅助方案 3）。

辅助方案 3　前鞭毛体和无鞭毛体的冷藏和复苏

材料（带√项目见附录 1）

对数生长的利什曼原虫前鞭毛体培养物（ATCC；见辅助方案 1，步骤 1～2），或新鲜分离制备的前鞭毛体（见辅助方案 2）

RPMI 1640 培养基，4℃和 37℃。

√2×冷冻保存液

70%（*V/V*）乙醇

√C-M199

冷冻容器（如 Nalgene Mr. Frosty or microprocessor controlled），容器外层装有异丙醇预冷

75cm² 灭菌组织培养瓶

1. 制备新鲜分离的无鞭毛体（5×10^7 溶于冷 RPMI；见辅助方案 2）或经辅助方案 1（步骤 1～2）培养的新鲜无鞭毛体培养物。收集对数生长（培养 2～3d）的前鞭毛体培养物，4℃，1500*g* 离心 10min，去上清，振动管子轻轻打碎细胞沉淀后加入冷 RPMI 配成 5×10^7 个细胞/ml 的浓度。
2. 以滴入方式加入等体积的 2×冷冻保存培养基。取 1ml 悬液加入预先标记的冷冻管中，置冰上 15min。将冷冻管转移到预冷的容器中，－70℃冰箱放置过夜后，将冷冻的寄生虫冷冻管放置液氮中保存。
3. 复苏时，从液氮中取出冷冻管，立即放入 37℃水浴，轻轻振荡至完全融化，70%乙醇擦拭小管表面。
4. 将寄生虫悬液加入灭菌的 15ml 聚丙烯离心管中，加入 10ml 温 RPMI（37℃），以滴入方式轻轻混匀。4℃或室温，3000*g* 离心 15min，弃上清。
5. 轻敲小管，重悬寄生虫于 10ml C-M199，加入 75cm² 培养瓶中培养。

解冻的无鞭毛体经过活力检测，也可直接用于感染动物（见辅助方案 2）。

辅助方案 4　血琼脂培养板的制备

材料（带√项目见附录 1）

兔血，去纤维蛋白（Rockland Immunochemicals）

√NNN 培养基（三 N 培养基：诺-尼-麦三氏细菌培养基，含琼脂、盐、兔血，用以培养黑热病病原体——译者注）

3～5mm 玻璃珠（Thomas）

43℃水浴

96 孔平底培养板，灭菌，带盖

1. 微波炉液化 70ml NNN 培养基，在水浴中降温到 43℃；取 30ml 预温 43℃的去纤维蛋白兔血与 NNN 培养基混合。
2. 将 96 孔板置于倾斜 70°～80°位置，加入混合液 50μl/孔，盖上盖子，parafilm 膜封口或放于加湿盒中。用前 4℃可保存 6～8 周。

参考文献：Hommel *et al.*，1995

撰 稿 人：David L. Sacks and Peter C. Melby

单元 11.2　弓形虫感染动物模型

鼠弓形虫 *T. gondii* 株对小鼠的致病力不同。RH 种系对初次感染的小鼠均有强烈的致病性（致死性）。相反，其他株如 ME49 因它们对小鼠无致死作用而被认为相对无毒。鉴于 ME49 被很多实验室用来研究机体对 *T. gondii* 的免疫反应，此处介绍的模型就用此株弓形虫感染制备。RH 和 C56 也被用来接种小鼠研究实验性疫苗免疫方案及试验抗生素制剂对寄生虫的疗效。小鼠种系、感染途径及接种物规格对感染结果至关重要（表 11.2.1）。不同的剂量可显著影响某种近交系小鼠对 *T. gondii* 的易感性。

表 11.2.1　注射 ME49 株的 *T. gondii*[a] 弓形虫包囊对不同种系小鼠的易感性

种系	急性感染		慢性感染(弓形体脑炎)
	口腔	腹腔内	
BALB/c	抗药	易感	抗药
C57BL/6	易感	抗药	易感
CBA/Ca	未知	抗药	易感

a. 不同种系小鼠由 Jackson 实验室提供。

注意： *T. gondii* 是生物安全 2 度（BL-2）的病原体。当接触这种微生物时，应该遵守适当的预防措施（见前言）。怀孕妇女不能接触活寄生虫及抗 *T. gondii* 抗体阳性的动物。操作此种微生物前应该掌握 *T. gondii* 感染后血清学变化规律，并保存血清以供今后参考。

注： 所有注入小鼠的材料和溶液必须无菌。

基本方案 1　诱导小鼠急性弓形虫 *T. gondii* 感染

材料（带√项目见附录 1）

T. gondii 弓形虫 ME49 株慢性感染（1 个月以上）的雌性小鼠（C57BL/6、CBA/Ca 或 Swiss-Webster）（见辅助方案 2）。
70%（*V/V*）乙醇
√PBS，pH2
无菌原体小鼠，雌性（6～8 周龄，见表 11.2.1 中易感品系）
剪刀
小钳状骨针
研钵和研棒
带 22G 针头的 1ml 或 3ml 注射器
载玻片和 22mm×22mm 的盖玻片
18G、1.5in（3.8cm）强饲针

1. CO_2 吸入法（附录 2G）处死感染 *T. gondii* 的小鼠，并用 70%乙醇清洗头部。切开皮肤暴露颅骨，用小弯剪刀打开颅骨，暴露大脑，取出大脑组织置于研钵中。
2. 脑组织研磨后加入 1ml PBS，用带有 22G 针头的 1ml 或 3ml 注射器反复的吸、吹悬液进行匀浆。
3. 取 20μl 样品滴于载玻片上，制三份片子，盖上 22mm×22mm 的盖玻片，100 倍显微镜下观察，并计数整个片子中的包囊数。计算三个片子的平均包囊数，换算出每毫升脑悬液中的包囊数。用 PBS 把脑匀浆液中的包囊稀释至所要求的浓度（50～500/ml）。

4a. 腹腔内感染：用带有 22G 针头的注射器给清洁级雌性小鼠腹腔注射 0.2ml 的脑组织匀浆液（通常含 10～20 个组织包囊）(附录 2E)。

　　所用的包囊数越多，BALB/c 与 CBA/Ca 小鼠之间的易感性的差异就越明显。膜内感染 20、40 或 80 个包囊后，分别有 12%、50%、75%的 BALB/c 小鼠感染 3 周内死亡，而在相应时间内没有观察到有感染的 CBA/Ca 小鼠死亡（Suzuki *et al.*, 1993）。

4b. 口腔感染：用 18G、1.5in 强饲针将 0.2ml 包囊悬液注射给清洁级雌性小鼠（一般 10～100 个包囊）。

5. 评估感染进展和（或）机体免疫应答（见辅助方案 1）。

基本方案 2　小鼠慢性弓形虫脑炎模型

材料（带√项目见附录 1）

无病原体易感品系小鼠（雌性 6～8 周；易感品系小鼠见表 19.3.1；饲养见单元 1.2）
√PBS，pH7.2
带有 22G 针头的 30ml 注射器

1. 用 10～20 个包囊的 ME49 经口腔或腹膜感染易感品系小鼠（见基本方案 1，步骤 4）。
2. 在感染后 4 周和 8～10 周（见辅助方案 1 的临床评估）用甲氧氟烷麻醉小鼠（附录 2D）。打开胸腔，用带 22G 针头注射器经左心室灌注 20ml PBS 入循环系统，去除大脑血液。
3. 如基本方案 1 中所述取出大脑，然后评估弓形虫脑炎进展情况（见辅助方案 1）。评估一个以上的参数，矢状分离大脑半球。

基本方案 3　感染 *T. gondii* 的重症联合免疫缺陷小鼠

重症联合免疫缺陷小鼠（SCID）缺少 T 细胞和 B 细胞。当用 ME49 感染小鼠时，感染后 2～3 周死亡。为制作慢性感染，可给予磺胺嘧啶，而当磺胺嘧啶停药后可造成感染的重新加重并死亡。此模型模仿弓形体脑炎在免疫宽容个体的发病机制。本实验可通过回输 T 细胞或其他细胞给 SCID 鼠来研究这些细胞对 *T. gondii* 的免疫应答。

材料

无病原体感染的 C. B-17S SCID 小鼠（雌性 6～8 周龄，Jackson 实验室供给）
磺胺嘧啶（Sigma）
Naive 小鼠淋巴细胞悬液（单元 2.1），*T. gondii* 免疫动物（即 ts-4 株感染的小鼠；见基本方案 4），或 ME49 慢性感染（1 个月以上）的 BALB/c 小鼠

1. 雌性 6～8 周龄 C. B-17S SCID 小鼠饲养于顶盖过滤型饲养笼内，置于层流柜，自动喂饮高压灭菌的食物和水。
2. 经口腔或腹腔给予 10～20 个 *T. gondii* ME49 包囊以感染小鼠（层流柜内操作，见基本方案 1）。
3. 慢性感染模型：感染后 3～10d 开始用磺胺嘧啶处理动物（200mg/L 饮用水），持续 3 周。

   停止应用磺胺嘧啶后，死亡率取决于感染后起始给药的时间，给药越早存活时间越长（如感染后 3d 给药，可存活 3 周）。

4. （细胞）过继试验：停止给磺胺嘧啶（再活化慢性感染模型）1d 前，静脉或腹腔给予 1×10^7～5×10^7 的 naive 小鼠或 *T. gondii* 免疫小鼠的淋巴细胞悬液（附录 2E 感染技术）。
5. 评估感染进展和（或）机体免疫应答（见辅助方案 1）。

基本方案 4　温度敏感的 TS-4 *T. gondii* 菌株的感染模型

ts-4 菌株是从 *T. gondii* 的 RH 菌株衍生而来的突变体，在 38℃时便可影响生长。ts-4 菌株不仅对免疫健全的小鼠无毒性，也不能产生组织包囊。此外，此菌株感染后可诱导机体产生对有毒株的免疫保护。从 ts-4 感染小鼠分离的 T 细胞可过继转移给 naive 小鼠，这种菌株的特性使其成为选择性过继转移试验理想的待选者。

材料（带√项目见附录 1）

T. gondii ts-4 菌株速殖子（见辅助方案 3）
无病原体雌性小鼠（6～8 周龄）
√HBSS
√PBS
带有 26G 针头的 1ml 注射器

1. 如辅助方案 3 中描述的，冷冻保存在人类（阴茎）包皮成纤维细胞中 ts-4 菌株速殖子，复苏时将水浴温度调至 33℃。按照辅助方案 3 的方法破碎细胞收集速殖子，并通过离心去除速殖子悬液中的人成纤维细胞。
2. 小鼠经腹腔注射含 1×10^4 速殖子的 PBS（附录 2E），4～8 周后，腹腔加强注射 2×10^5 速殖子。再经过 2～4 周，重复加强一次。
3. 最后一次加强注射（附录 2H）1 周后，无菌收集脾脏，制备脾脏细胞悬液，用 HBSS配成 1×10^8～2×10^8 个细胞/ml 的悬液（单元 2.1）。
4. 用带有 26G 针头的 1ml 注射器，将 0.2ml 细胞悬液（2×10^7～4×10^7 个）经尾脉注射入 naive 小鼠中（附录 2E）。

辅助方案 1　对 *T. gondii* 感染进展和免疫应答的评估

根据试验目的，可选择以下一个或多个合适的参数。

临床评估

每天检测动物两次，记录疾病体征（竖毛、蜷缩成团、呼吸急促）、死亡率和存活时间。当研究弓形体脑炎时，应需特别注意检查感染后 4～10 周这段时间的情况。

组织病理学和免疫组织化学检测

材料（带√项目见附录 1）

T. gondii 感染的小鼠（见基本方案 1、2 或 3）
√固定剂
抗 *T. gondii* 多克隆抗体（BioGenex Laboratories）

1a. *T. gondii* 急性感染模型：感染后第一周的不同时间，CO_2 吸入法处死小鼠（附录 2G），取出肝脏、肺脏、心脏、大肠、小肠和肠系膜淋巴结（口腔感染情况下）做组织病理学检查。
1b. 弓形虫脑炎模型：采用 CO_2 吸入法处死小鼠。（对免疫潜能健全动物）感染 4～10 周后取大脑，而对 SCID 小鼠制备的慢性感染模型，在磺胺嘧啶停药后要每周进行上述操作（见基本方案 3）。
2. 所取部分器官在固定液中室温固定过夜。
3. 每种器官制备 2～4 份 5μm 厚度的组织切片（间隔 50～100μm）。
4. 苏木精/伊红染色标本，观察炎性改变，并用抗 *T. gondii* 多克隆抗体对 *T. gondii* 病

原体及抗原进行免疫组化检测。检测含有 *T. gondii* 的寄生虫空泡的数量。

其他器官像脑、脾脏、肾脏在急性感染阶段表现较弱程度的炎症反应。应在感染 2 周后，一般在感染后 14～18d，从 ME49 急性感染的 SCID 小鼠收集器官，检测心脏、肝脏和肾脏中炎症反应。

PT-PCR 测表面抗原 1（SAG-1）和表面抗原 2（SAG-2）mRNA

材料

T. gondii 感染小鼠（见基本方案 1、2 或 3）

引物和探针

SAG-1：

引物有义链：5′-ATGTCGGTTTCGCTGCACTTC-3′（311～334）

引物反义链：5′-TCACGCGACACAAGCTGCGATAGAGCC -3′（1295～1321）

探针：5′-GCTAGTCTCGACACGGCAGGC-3′

SAG-2：

引物有义链：5′-ATGAGTTTCTCAAAGACCACGAGCCTAGC -3′（182～210）

引物反义链：5′-TTACACAAACGTGATCAACAAACCTGCGAGA -3′（710～742）

探针：5′-CGAGGAAGTTGACGACTGTCC-3′

1a. *T. gondii* 急性感染模型：感染后 7d 取肝脏和肺脏，用研钵和研棒在 PBS 液中研磨、匀浆（见基本方案 1）。

1b. 弓形体脑炎模型：感染后 4～10 周取脑，用研钵和研棒在 PBS 液中研磨、匀浆（见基本方案 1）。

除肝脏、肺脏和脑外的其他器官也适合评判寄生虫感染。

2. 分离 mRNA（如 CPI 单元 10.11）。采用半定量反转录 PCR（RT-PCR；如单元 14.5），根据速殖子阶段基因特异性表达的 mRNA［SAG-1 和（或）SAG-2］水平来评价寄生虫感染情况。按照以下的 PCR 程序用 SAG-1 和 SAG-2 引物和寡核苷酸引物进行扩增：

起始阶段：	3min	95℃	变性
35 个循环：	1min	95℃	变性
	1min	54℃	复性
	2min	72℃	扩增

根据预试验决定循环次数来扩增所需 cDNA 的 PCR 产物。

用 ELISA 或 RT-PCR 法检测细胞因子来评估急性弓形虫感染或弓形虫脑炎

急性弓形虫感染（见基本步骤 1）可通过检测感染后 1 周内不同时间的血浆细胞因子水平来评估。感染前后尾静脉取血或处死动物时收集血浆样品，需－70℃保存。这些血浆样品，同感染 1 周获得的腹腔灌洗液一样，可用 ELISA 法来检测如 IFN-γ、TNF-α、IL-12 等细胞因子水平（第五章）。同样的，感染后（单元 14.5）的各种组织如脾脏、肝脏、肺脏和腹腔细胞可通过制备 RNA，采用 RT-PCR 的方法测得 IFN-γ、

TNF-α、IL-2、IL-4、IL-10、IL-10p35 和 IL-12p40 的 mRNA 表达。细胞因子分泌和 T 细胞增殖反应可用 *T. gondii* 抗原（速殖子或寄生虫融胞抗原产物）体外刺激脾细胞或腹腔细胞后测定，并用刀豆素作对照。体外刺激最佳的抗原浓度和刺激时间需由试验者决定。最后，弓形虫脑炎（见基本方案 2）在感染后 4～10 周时可通过检测脑组织表达这些因子 mRNA 的水平来判定。这个方法需要将脑组织匀浆（见基本方案 1）后用 RT-PCR 法检测感兴趣的细胞因子（单元 14.5）。如果用弓形虫慢性感染 SCID 小鼠模型（见基本方案 3），需在磺胺嘧啶停药后隔周收集脑组织并用 RT-PCR 检测细胞因子产物。在准备脑组织用以检测细胞因子转录之前，应用 PBS 灌注循环系统（如基本方案 2 中所示），以免血液污染造成错误的结果。

包囊数目评估弓形体脑炎

免疫潜能健全小鼠感染后 4～10 周或 SCID 小鼠慢性感染模型在磺胺嘧啶停药后隔周测定脑包囊数来判定感染。感染小鼠的大脑组织一半用 PBS 制备匀浆，取 3 次 20μl 样品（见基本方案 1）来计数包囊数，测定每个样本的平均值后计算脑组织的平均包囊数。

抗体反应和白细胞分布改变的判定

尾静脉采血（附录 2F）或处死动物时收集血浆后－70℃保存。抗 *T. gondii* 抗体的产生可在第 7 天收集的血清中检测到。特异性 IgG 抗体可用凝集试验来检测（Desmonts and Remington，1980）。根据试验目的不同，在感染后不同时间，可用 FACS 测得白细胞在脾脏、腹膜、肠内黏膜、肠系膜淋巴结和其他淋巴结等不同淋巴组织中的分布情况。

辅助方案 2 ME49 *T. gondii* 包囊种子库的维持和保存

避免包囊的反复传代，因为这样可以增加这种病原体的毒性。感染的 Swiss-Webster 小鼠应作为种子库“长期”饲养，并只被用来感染 C57BL/6 或 CBA/Ca 小鼠，继而获得更多的包囊用来试验。比较合理的是，Swiss-Webster 小鼠包囊一年内接种 1 或 2 次。

附加材料（其他材料见基本方案 1）

无病原体 Swiss-Webster 小鼠，C57BL/6 小鼠和 CBA/Ca 雌性小鼠（6～8 周龄；Jackson 实验室供给）

含有 *T. gondii* ME49 菌株包囊的小鼠大脑（从 C. Subauste 获得）

1. 从小鼠大脑获得组织包囊悬液（见基本方案 1）。
2. 10～20 只 Swiss-Webster 小鼠，每只腹腔内注射（附录 3E）10～20 个 *T. gondii* ME49 菌株包囊。
3. 感染后至少 1 个月及需要用 ME49 包囊前至少 4 周，处死一只感染的 Swiss-Webster 小鼠（一只鼠通常足够用于多种目的），取脑包囊悬液（见基本方案 1，步骤 1～3）
4. 腹腔内注射 10～20 个包囊感染 C57BL/6 小鼠或 CBA/Ca 小鼠（见基本方案 1 步骤

4a）。

从每只 Swiss-Webster 小鼠脑能获得 300～1000 个 ME49 包囊，每只 C57BL/6 小鼠脑能获得 700～1100 个 ME49 包囊，每只 CBA/Ca 小鼠脑能获得 3000～4000 个 ME49 包囊。

辅助方案 3　用人类包皮成纤维细胞保存 *T. gondii* 速殖子

材料（带√项目见附录 1）

人类包皮成纤维细胞（HFF；Hs68；ATCC＃CRL 1635）

T. gondii RH 株速殖子（ATCC＃50174）或 ts-4 菌株（ATCC＃40050）

√含有 1%和 10%（*V/V*）热灭活 FBS 的 DMEM 完全培养基

组织培养瓶（25cm^{2}或 75cm^2）

倒置相差显微镜

细胞刮片

1. HFF 置含 10%FBS 的 DMEM 的组织培养瓶中培养。
2. 培养基中加入 *T. gondii* 速殖子至 1×10^6 个细胞/ml（25cm^{2}组织培养瓶中加入 5ml 培养基或 75cm^{2}组织培养瓶中加入 15ml 培养基）。

   该速殖子的量在 2d 内可明显溶破 HFF 细胞层。隔周用 1/10 量感染传代 RH 速殖子。
3. HFF 单层细胞在培养瓶底长满后，吸弃培养液上清。加入含有速殖子的培养基，37℃孵育（RH 菌株）或 33℃孵育（ts-4 菌株）。每天用倒置相差显微镜观察单细胞层中成纤维细胞内病原体复制形成的玫瑰花结构。
4. 当大多数成纤维细胞内含大量速殖子时，用细胞刮片破坏单细胞层以释放病原体。
5. 用速殖子进行试验或将适当数量的速殖子加入其他 HFF 单细胞层。不需要最佳活力病原体时（即准备 *T. gondii* 融胞产物抗原；见辅助方案 5），破坏单细胞层后，收集含有细胞外速殖子的培养基。

辅助方案 4　小鼠体内保存 *T. gondii* 速殖子

当用 ME49 株包囊或 ts-4 株速殖子开始实验时，也可用以下步骤，但并不是获得试验用速殖子的理想步骤。

材料（带√项目见附录 1）

无特定病原体 Swiss-Webster 雌性小鼠（6～8 周龄；Charles River Lab）

T. gondii RH 株速殖子（ATCC＃50174）

70%乙醇

√PBS

台式离心机

带有 22G 针头的 1～3ml 注射器

50ml 离心管

载玻片和 18mm 盖玻片

1. 融化装有速殖子的冷冻管（附录 3B）。4℃，500*g* 离心 10min 速殖子悬液，吸取上清。重悬浮于 0.4ml PBS 后，两只 Swiss-Webster 小鼠腹腔内各注射一半体积的悬液。
2. 一天观察两次小鼠的病征（见辅助方案 1）。当疾病症状明显出现后，CO_2 吸入法处死小鼠（附录 2G）。
3. 70%乙醇清洁腹部，切开腹壁。用 3ml 带有 22G 针头的注射器加 2～3ml PBS 进行腹腔灌洗（见单元 6.1，基本方案 1 的技术，但灌洗液改为 PBS）。取出灌洗液，装入 50ml 离心管。
4. 将 0.1ml 灌洗液转移到含有 0.9ml PBS 的微量离心管中。用带有 22G 针头的 1ml 注射器加一滴稀释液到载玻片上，盖上盖玻片，400 倍视野计数速殖子。

5a. 2d 转移：如果稀释的灌洗液每 400 倍视野含 18～20 个速殖子，用 0.2ml 灌洗液（未稀释）腹腔内注射小鼠（附录 2E）。如果计数不在此范围内，增加注射量或对原始灌洗液进行相应稀释。感染后 2d 处死小鼠，如步骤 3～4 中，收集速殖子。

速殖子融化后，在小鼠体内显示出稳定的生长速率可能需要 1～2 周的时间。以上步骤应由试验者进行摸索和规范。

5b. 3d 转移：如果稀释的灌洗液每 400 倍视野含有 12～18 个速殖子，用 0.2ml 稀释灌洗液腹腔内注射小鼠。感染后 3d 处死小鼠，如步骤 3～4 中，收集速殖子。

虽然 3d 转移法获得的速殖子与 2d 转移法获得的相似，但感染后 3d 获得的病原体的感染性较低。

辅助方案 5　*T. gondii* 裂解物抗原的准备

采用反复冻融的方法制备抗原，如果试验所用试剂的内毒素含量低，则抗原裂解物中含内毒素浓度也低。

材料（带√项目见附录 1）

用人包皮成纤维细胞（HFF）培养出来的 *T. gondii* 的 RH 细胞株速殖子（见辅助方案 3，至少感染五瓶 75cm^2）

√PBS，pH7.2，4℃

带有 H-1000B 转头的 Sorvall 离心机（或等同的），15ml 和 50ml 的离心管

载玻片和盖玻片

液氮或干冰

1. 将含 *T. gondii* RH 株速殖子的 HFF 细胞裂解培养液加入到 50ml 的离心管中，4℃，900*g* 离心 10min，弃上清，重悬于 10ml 1×PBS 中。

   从感染小鼠腹腔液中收集的速殖子有可能污染一定的内毒素。

2. 4℃，70*g* 离心 5min，分离并丢弃小鼠细胞，取上清到另一个新离心管中，4℃，900*g* 离心 10min，弃上清，重悬沉淀于 1ml 1×PBS。
3. 用 90μl PBS 稀释 10μl 悬浮液，取 9μl 于载玻片上后，盖上盖玻片。400 倍下，计数速殖子，并检查有无小鼠细胞。

4. 加入 10ml 1×PBS，4℃，900g 离心 10min，弃上清。
5. 用 4℃无菌蒸馏水溶解沉淀，速殖子数应该至少每毫升含 5×10^8 个，用液氮或干冰速冻液体，然后在 37℃水浴中速溶，重复至少两次。

   寄生虫也可以用超声波进行破碎，每次 20s，进行四次。但超声波也会引起内毒素的污染。

6. 将等量的 4℃ 10×PBS 加入到含裂解物蒸馏水溶液中，调整到 1×PBS 的浓度。4℃，900g 离心 20min，收集上清液，分装，−70℃保存。

参考文献：Subauste *et al*.，1991；Suzuki *et al*.，1988

撰 稿 人：Carlos Subauste and Jack Remington

单元 11.3　巨细胞病毒感染小鼠模型的建立

由于巨细胞病毒（CMV）具有严格的种属特异性，所以不能用人源巨细胞病毒来感染动物。因此，通过建立啮齿动物的巨细胞病毒（如小鼠、大鼠和豚鼠）感染模型，来认识人巨细胞病毒引起的疾病并回答临床研究中不解的问题。

注：鼠的巨细胞病毒由于不能感染人类，不存在危险性。所以一般的组织培养实验室，只要有层流通风柜、显微镜和细胞培养箱，都可以进行鼠的巨细胞病毒的繁殖和纯化。

注：所有的组织培养程序，病毒和细胞的准备都要在层流通风柜中进行无菌操作。除非有特殊的情况，细胞和病毒都要在 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中培养。

基本方案　巨细胞病毒感染小鼠模型

动物的喂养应该在 SPF 的环境中。鼠巨细胞病毒感染小鼠后，要进行分别喂养，以防止实验组和对照组之间的病毒交叉感染。

材料（带√项目见附录 1）

BABL/c 小鼠（新生或成鼠）或其他品系
纯化的鼠巨细胞病毒（mCMV；见辅助方案 1）或唾液腺病毒（SGV，见辅助方案 2）
√完全培养基
钢网（0.45mm）

1a. 感染新生小鼠：用 10～100pfu 纯化的鼠 CMV 或 SGV 腹腔注射感染新生 BABL/c 小鼠，腹部皮下进针，针头近胸腔部位注射。

   新生小鼠感染成功至少要用 100pfu 病毒。用 1000pfu 病毒感染会引起严重的疾病（发育不全、脱毛、生长停止）和高死亡率。

1b. 感染成鼠：用纯化的 1×10^5 pfu 鼠 CMV 或 SGV 腹腔注射、皮下（足垫）注射或者静脉注射（附件 2E）感染 BABL/c 成鼠。

   SGV 具有很高的毒性，BABL/c 成鼠 LD_{50} 用量约 100 000pfu。用这个剂量感染

小鼠会引起严重的并发性肝炎。

2. 分别在第 7、14、21 天处死（附件 3G）感染的小鼠，取器官（如唾液腺、脾、肝；附件 2H）冻存在塑料管中。−70℃保存各个器官直到测定病毒滴度。
3. 融化器官，用注射器的柱塞（或其他类似无菌器械）反复在 0.45mm 钢网上挤压器官，收集培养皿中的匀浆产物，用大约 4ml 的完全培养基冲洗钢网并收集，总体积约为 5ml。
4. 立即用细胞空斑形成试验检测组织匀浆稀释液中鼠 CMV 滴度（辅助方案 3）。

   脾、肝、肺脏中病毒滴度峰值出现在感染小鼠后的第 11～14 天，而在唾液腺中增殖的病毒滴度峰值出现较内脏器官中的晚一些。

辅助方案 1　巨细胞病毒的准备

很多细胞系适合用来繁殖病毒，但由于小鼠胚胎成纤维细胞具较高的繁殖能力，更适合用于繁殖病毒。通常用非纯化的病毒来感染培养的细胞，而感染小鼠则需要用纯化的病毒。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠胚胎成纤维细胞（MEF；见辅助方案 4）或其他合适的细胞（例如，NIH 3T3，10%～30%汇合生长，ATCC ＃CRL-1658；BALB/c 3T3，ATCC ＃CCL-163；M2-10B4，ATCC＃CRL-1972）
√完全培养基
小鼠巨细胞病毒（mCMV）：Smith 株（ATCC＃VR-194，VR-1399）或者 K181 细胞株
√15%（*m*/*V*）蔗糖/VSB
$165cm^2$ 组织培养皿
一次性的细胞刮刀
离心机（例如，Beckman J2-21，转子 JA-10，JA-14；或者 Sorvall RC-5，转子 GS3，GSA）
500ml 和 250ml 无菌离心管
Dounce 匀浆器及研磨棒（Kontes 或 Wheaton）
带有外旋转转头的超速离心机（Beckman SW28 或其他相似的）及 20ml 的超速离心管
0.45μm 无菌过滤器（任选）

1. 在 $165cm^2$ 组织培养皿中用完全培养基培养 MEF 细胞，每隔 2～3d，按照 1∶3 的比例传三代。培养至细胞面积占据培养皿面积的 70%～80%（细胞培养 2～3d 后）。
2. 吸去培养基，加入大约 10^5pfu 经过病毒滴度测定的小鼠 CMV（0.01pfu/个细胞），在 37℃，5% CO_2 孵箱中培养至细胞完全感染病毒（3～5d）。可观察到培养的细胞变圆（细胞病变效应，CPE）。

制备未纯化的病毒：仅为细胞释放病毒

3a. 制备 1ml 和 4ml 含有病毒的上清液保存于−70℃（可稳定保存一年）。部分用于测

定病毒滴度（见辅助方案 3）。

制备未纯化的病毒：细胞释放的及与细胞内的病毒

3b. 吹打细胞（必要时可用细胞刮刀），收集细胞及上清液。经过 2～3 次的细胞反复冻融将包含在细胞里的病毒释放出来。将部分存储，按照步骤 3a 进行病毒滴度的测定。

未纯化的病毒滴度通常大约在 2×10^6 pfu/ml。反复的冻融会稍微降低病毒滴度，但可使感染的细胞裂解从而释放细胞中的病毒。这样获得的病毒液中由于含有较多的病毒衣壳成分，减少了病毒颗粒的百分含量。

制备纯化的病毒：细胞释放的及与细胞内的病毒

3c. 吹打细胞（必要时可用细胞刮刀），将细胞及上清液转移入无菌的 500ml 离心管（不用反复冻融）。4℃，6400*g* 离心 20min，将上清液转移到 250ml 无菌离心管中。

4c. （可选）：用 5ml 冷的完全培养基重新悬浮细胞，冰上匀浆 20 次裂解细胞。4℃，22 000*g* 离心 10min 后，将上清液转移进步骤 3c 中的病毒上清液中。

5c. 4℃，26 000*g* 离心至少 3h 收集病毒。弃上清，把带有少量残余培养基的沉淀放于冰上，4℃过夜。

6c. 用残留的液体重新悬浮沉淀，冰上匀浆 20 次。把病毒转移至含 18ml 的 15%蔗糖/VSB 液的 20ml 超速离心管中。4℃，外旋转转头 72 000*g* 离心 1h。

7c. 轻轻倒掉上清，加入 4ml 15%蔗糖/VSB 混匀后，冰上过夜。小心的悬浮病毒（如有需要可再次匀浆）。

8c. 可选：用 0.45μm 无菌过滤器过滤悬浮液，除去病毒的壳体及聚合物。

9c. 把过滤的病毒液分装成 20μl，保存于－70℃（可稳定的保存一年）。部分用于测定病毒滴度（见辅助方案 3）。

由于体积的减少，纯化的病毒滴度较高（10^7～10^9 pfu/ml），但在纯化的过程中，病毒的感染力会降低。反复的冻融也会降低滴度，应尽量避免。

辅助方案 2　唾液腺病毒的制备

从唾液腺中产生的病毒（SGV）的毒性比其他器官和培养细胞产生的病毒毒性大。

材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

BALB/c 小鼠（4～6 周龄）

√PBS

1. 给 4～6 周 BALB/c 小鼠足垫注射 2×10^5 pfu 组织培养来源的病毒。
2. 2 周后处死小鼠（附录 2G），收集唾液腺，混合集中腮腺、较大的舌下腺和下颌腺。保存腺体于－70℃（可稳定的保存一年）。
3. 制备组织匀浆（见基本方案步骤 3），用 PBS 代替完全培养基冲洗钢网。整个过程冰上操作。
4. 测定经过唾液腺组织匀浆中的病毒滴度（见辅助方案 3），用 5×10^4 pfu 经腹腔内感

染新小鼠。

5. 重复步骤 2～4，至少 3 次以上（生产更多的病毒）。
6. 从第 3 次（或更多次）感染的小鼠体内取腺体，集中每次得到的腺体后进行匀浆 20 次。4℃，800g 离心 5min。
7. 将上清液转移到一个新的管中，用 3～5ml 的 PBS 重新悬浮沉淀物，匀浆，再次离心。将上清液收集到一起，分装成 250～500μl 冻存于－70℃（可稳定的保存一年）。取一小部分测定病毒滴度（见辅助方案 3）。

辅助方案 3　用空斑形成细胞试验测定巨细胞病毒滴度

材料（带√项目见附录 1）

小鼠胚胎成纤维细胞（MEF；见辅助方案 4）或其他合适的细胞（例如，NIH3T3，ATCC＃CRL-1658；BALB/c 3T3，ATCC＃CCL-163；M2-10B4，ATCC＃CRL-1972）

试验样品：CMV 感染的小鼠器官匀浆（见基本方案），小鼠 CMV 保存液（未纯化或纯化，见辅助方案 1），或唾液腺病毒（见辅助方案 2）。

√完全培养基

√黏稠培养基

倒置显微镜

48 孔组织培养板

平板离心机（可选）

1. 滴定的前一天接种 MEF 于 48 孔组织培养板中，完全培养基培养。需一定的细胞密度接种，待测定时大约长满 80％。

2a. 对组织器官匀浆液病毒：充分匀浆含病毒的器官组织后，加入 250μl 的匀浆液到 4.75ml 的完全培养基（1/20），进行一系列 $\log_{10}$ 倍数稀释，从前一个稀释度中吸取 500μl 液体与 4.5ml 完全培养基混合，每一步都要混匀。对组织培养产生的病毒或唾液腺病毒，稀释度 0.5×10^{-2}～0.5×10^{-8}。

2b. 对病毒储存液的稀释：用完全培养基从 10^{-3}～10^{-10} 进行一系列 $\log_{10}$ 倍数稀释。

3. 每孔加入 500μl 的病毒稀释液，每一个稀释度至少做三个复孔，为增加测定的敏感度，48 孔培养板 800g 离心 30min（可选）后，37℃，孵育 1h。
4. 移去培养基，用无菌的烧杯或者移液管每孔添加 0.5～1.0ml 黏稠培养基。37℃，孵育 4～5d。
5. 在倒置显微镜下进行病毒斑计数，计算出每毫升病毒所形成的病毒斑数（pfu）。

　　在显微镜下，病毒有效感染成纤维细胞后细胞变圆，形成斑点，最后细胞死亡。1pfu 对应大约 500 病毒。

辅助方案 4　原代小鼠胚胎成纤维细胞的制备

材料（带√项目见附录 1）

孕鼠（品系不重要）

√PBS：无钙镁离子

胰蛋白酶溶液：0.25%（*m/V*）胰蛋白酶/1mmol/L EDTA 溶解于 PBS 中

√完全培养基

无菌的外科手术器械：剪刀、解剖刀、镊子

2～4mm 的无菌玻璃球

无菌纱布或不锈钢网（0.45mm 的格子大小）

$165cm^2$ 组织培养皿或者 $175cm^2$ 组织培养瓶

1. 采用脱颈的方法处死怀孕 17～18d 的小鼠（附录 2G）。手术取下小鼠的胚胎，尽可能的取下胚胎的肝和肠。
2. 无菌操作，避免污染。用剪刀或解剖刀在培养皿中切碎胚囊，用 PBS 冲洗组织碎片，去除红细胞和细胞碎屑。
3. 把组织块转移到 500ml 无菌的锥形瓶中。每 5～8 个胚囊（一层），加入 30ml 的胰蛋白酶溶液，无菌磁力搅拌，用足够多的 2～4mm 的无菌玻璃柱覆盖瓶底。37℃慢慢摇动 30min 或室温放置约 1h。
4. 加 30ml 的胰蛋白酶和 10ml PBS 到组织块中，37℃搅拌 30min。再重复一次（总共三次加入胰蛋白酶并孵育）。

   过量的胰蛋白酶能降低细胞的生存能力，相反胰蛋白酶消化不足会降低细胞的得率。

5. 用几层无菌纱布或 0.45mm 不锈钢网过滤细胞液（110ml）。室温，250*g* 离心细胞悬液 10min。弃上清液，用 10ml 的完全培养基重新悬浮沉淀细胞。

   每次搅动后，在添加胰蛋白酶到余下的组织碎片中前，过滤和离心（步骤 5）可以交替进行。建议超过三次的胰蛋白酶消化用此方式来提高细胞的得率。

6. 用台盼蓝试验（附录 3C）测定活细胞的浓度，并接种 1×10^7～2×10^7 细胞于 $165cm^2$ 组织培养皿或者 $175cm^2$ 组织培养瓶中，在 37℃，5% CO_2 孵箱中孵育过夜。
7. 第 1 天，除去培养基和细胞碎屑，添加新鲜的培养基，继续孵育 2d 以上。
8. 第 3 天，当细胞连成一片，冻细胞（每一个平皿分成九份）于液氮中（可稳定的保存一年）或者按照 1∶3 的比例进行传代。第四代细胞可用于繁殖病毒。

参考文献：Mocarski，1996；Reddehase and Lucin，1993

撰 稿 人：Wolfram Brune，Hartmut Hengel，and Ulrich H. Koszinowski

单元 11.4　单核细胞增生性利斯特氏菌感染动物模型

表 11.4.1 列举了常用的单核细胞增生性利斯特氏菌株及对小鼠的致病力。

注意：单核细胞增生性利斯特氏菌是一种能引起人类严重的，甚至是致命性疾病的病原生物，尤其是对怀孕妇女、风湿病患者、患有免疫性疾病的人及接受免疫抑制药物（包括类固醇类）治疗的人。所有接触活菌的工作都要在生物安全达到 2 级的实验室（BL-2）进行（见前言）。计划用该菌进行任何实验者都要事先咨询生物安全指导及批准。

表 11.4.1　常用的单核细胞增生性利斯特氏菌株

细胞株	其他名字/特性	相对毒性[a]	提供者/参考资料
43251	SLCC53	高	ATCC[b]
10403s		非常高	Bishop and Hinrichs(1987)
43250	非利斯特氏菌分泌	低	ATCC[b]
15313		高	ATCC[b]
EGD Sv1/2a		高	Kaufmann *et al*. (1986)

a. 不同的实验室小鼠品系的敏感性变化较大（表 11.4.2）。

b. American Type Culture Collection。

基本方案　用单核细胞增生性利斯特氏菌株感染小鼠

单核细胞增生性利斯特氏菌可通过口服、腹腔内（i. p.）、皮下（s. q.）、静脉（i. v.）注射途径感染小鼠。每一种途径都有各自的优缺点。最常用的是通过静脉途径感染小鼠，由于其具有①高繁殖能力，②快速的全身性感染，③从静脉途径感染的小鼠肝脏和脾脏分离出细菌显示间质感染的机会大于 i. p. 感染腹膜炎的效果。下面的实验方案介绍了直接感染小鼠并诱导出长期免疫力的方法。实验之前首先需要知道单核细胞增生性利斯特氏菌所要感染的小鼠品系的近似 LD_{50}，感染小鼠的剂量只用 1/10 的 LD_{50}，如免疫 BALB/c 小鼠时，通常每次所用剂量是 2000 单核细胞增生性利斯特氏菌的 10403s 株。

材料（带√项目见附录 1）

单核细胞增生性利斯特氏菌（单元 6.6 和单元 7.7）
无菌的脑、心脏浸剂（BHI）肉汤培养基（Difco）
√PBS
小鼠（表 11.4.2）
分光光度计
红外线灯
小鼠操控装置
1ml 吸管
27G 针头

表 11.4.2　不同品系小鼠对单核细胞增生性利斯特氏菌的敏感性[a]

敏感性	中间体	有抵抗力的
BALB/c	(C57BL/6×BALB/c)F_1	C57BL/6
C3H/HeJ		B10. D2
129/J		B10. A
DBA2		B6. PL
CBA/H		SJL/WEHI

a. 数据来自于 Cheers and McKenzie（1978）。

1. 准备单核细胞增生性利斯特氏菌（如 10403s 菌株），用无菌 BHI 肉汤培养基 37℃ 培养，也可用无菌的 BHI 肉汤琼脂平板（单元 7.1），或胰蛋白胨磷酸盐肉汤（单元

6.6）进行培养。

2. 测定 600nm（A_{600}）的吸光率检测早期对数生长期的细菌生长，用 PBS 把浓度调整到 10 000 个细胞/ml。

　　由于单核细胞增生性利斯特氏菌的生长速率和吸光率的差别，在感染小鼠之前最好进行标准化的处理。用肉汤 37℃培养单核细胞增生性利斯特氏菌，每隔 1h 测定 A_{600} 处的吸光度，持续测定 6～8h。在每个时间点，培养物用 PBS 稀释，接种在无菌肉汤琼脂平板上培养 24h，用平板上的细菌克隆数来验证相关的 A_{600} 数值。43251、10403s 细胞株在 A_{600} 处每 0.1 代表了大约 2×10^8 个细胞/ml 细菌。

3. 红外线灯照射小鼠 5～10min，把小鼠放进一操控装置，用 1ml 注射器和 27G 针头经小鼠尾静脉（附录 2E）接种 0.2ml 稀释的利斯特氏菌液（2000 细菌）。把小鼠放置于 BL-2 实验室进行特异性的免疫反应实验（见辅助方案 1）或者诱导细菌特异性 T 细胞系（见辅助方案 2）。

　　利斯特氏菌感染小鼠 7～8d 产生特异的 T 细胞反应。如果免疫的小鼠是用来研究机体对利斯特氏菌的特异性免疫反应，要在感染 3 周、最好 5 周进行实验，以排除非特异性的炎症反应的干扰。

辅助方案 1　小鼠感染利斯特氏菌后的特异性和固有免疫反应评估

单核细胞增生性利斯特氏菌感染小鼠 5～7d 后机体产生针对利斯特氏菌特异性的免疫反应，最终清除感染小鼠肝脏和脾脏中的细菌。因此，以下方案采用亚致死量的利斯特氏菌感染小鼠，分析感染后 48～72h 的固有免疫反应及 7～10d 后的特异性免疫反应能力。

附加材料（其他材料见基本方案）

非免疫小鼠（可选）
0.05%（*V/V*）Triton X-100
无菌的脑、心脏浸剂肉汤琼脂平板
无菌不锈钢滤网
50mm 无菌培养皿
12mm×75mm 无菌聚苯乙烯管
无菌玻璃涂棒

1. 准备单核细胞增生性利斯特氏菌（见基本方案步骤 1～2），调整浓度到 10^6 个细胞/ml。每一个实验组注射 3～5 只小鼠，每只小鼠注射 0.2ml（2×10^5 个细菌，见基本方案步骤 3）。

　　这个剂量代表了约 10×BALB/c LD_{50}，因此只适合用于具有同样免疫力的小鼠。正常（naive）小鼠可用来检测用亚致死量的单核细胞增生性利斯特氏菌通过 i.v. 感染小鼠后所产生的特异性免疫反应和固有免疫反应，可在感染小鼠 48～72h 检测固有免疫反应及在 7～10d 检测特异性的免疫反应。

2. 把感染后的小鼠置于 BL-2 实验室 24～48h。每天观察小鼠的得病状态（毛色、精神状态），处死即将死亡的小鼠。

3. 把不锈钢滤网分别放到两个各加有5ml含0.05% Triton X-100的50mm无菌培养皿中。感染小鼠24～48h后，脱颈处死小鼠（附录2G），取脾脏和肝脏各自放于滤网上。用5ml注射器的橡胶棒挤压脾脏和肝脏，通过滤网，使Triton X-100和组织混匀。
4. 准备3个无菌的12mm×75mm无菌聚苯乙烯管，各加入0.9ml的0.05% Triton X-100。第一个管中加入0.1ml的组织匀浆液，混匀，再从第一个管中取0.1ml混匀液加入第二个管中，混匀。第三个管子添加第二个管子里的0.1ml混匀液。
5. 从每一个稀释的管中取出10μl放于新鲜BHI琼脂平板的中央，用无菌玻璃涂棒涂匀接种。平板置于37℃温箱中孵育24h。
6. 统计每一个平板的克隆数，根据所涂布液体的体积和稀释度，计算出每个器官里所含有的细菌总数。

辅助方案2　利斯特氏菌特异性T细胞的制备

目前已经建立了$H2^d$单倍体型小鼠的实验方案——例如，BALB/c、DBA/2或CB6（C57BL/6×BALB/c F_1）。下面所述实验方案的部分内容可以经过修改用于其他品系的小鼠中，如此可获得同系的巨噬细胞株。利斯特氏菌特异性的CTL细胞系可在体外用利斯特氏菌感染的巨噬细胞重复刺激产生。CTL细胞系的维持也依赖于感染利斯特氏菌的巨噬细胞所呈递的特异性抗原表位的诱导。如果特异性抗原表位能够被已知的利斯特氏菌特异性的T细胞所识别，那么在体外用肽包被的刺激细胞也能使利斯特氏菌特异性的T细胞增殖（表11.4.3）。在体外刺激细胞增殖的最佳肽浓度需要通过每一种肽的滴定实验来确定。

表11.4.3　利斯特氏菌诱导的CTL抗原表位

抗原表位	抗原	肽序列	呈递的MHC分子	肽体外刺激的最佳浓度
LLO_{91-99}	利斯特氏菌裂解物	GYKDGNEYI	$H2-K^d$	10^{-9}mol/L
$p60_{217-225}$	p60	KYGVSVQDI	$H2-K^d$	10^{-8}mol/L
$p60_{449-457}$	p60	IYVGNGQMI	$H2-K^d$	10^{-6}mol/L
mpl_{84-92}	利斯特氏金属蛋白酶	GYLTDNDEI	$H2-K^d$	10^{-6}mol/L
f-MIVIL	未知	f-MIVIL	H2-M3	10^{-6}mol/L
f-MGWII(A)	LemA	f-MGWII(A)	H2-M3	10^{-6}mol/L
f-MIVTLF	引导肽(转录衰减子)	f-MIVTLF	H2-M3	10^{-6}mol/L

附加材料（其他材料见基本方案和辅助方案1，带√项目见附录1）

J774巨噬细胞样细胞（ATCC＃TIB 67）
√无抗生素的完全培养基10
含5μg/ml庆大霉素的完全培养基10（其他的抗生素代替）
单核细胞增生性利斯特氏菌感染的小鼠（见基本方案）
填充用的脾细胞
大鼠刀豆凝聚素A（ConA）活化上清（单元2.12）

1mol/L α-甲基甘露糖苷
正常（未感染）同系 BALB/c 小鼠
1mmol/L 合成肽溶液（可选；见表 11.4.3）
10cm 组织培养板（如 Falcon）
$25cm^2$ 组织培养瓶（如 Falcon）
γ 射线
0.22μm 注射器式滤器（可选）

1. J774 细胞在不含抗生素的 RPMI-10 的 10cm 组织培养板中培养至少 1d，收集细胞，用移液管吸取冷的 PBS 轻轻地吹打细胞后，取部分用台盼蓝染色进行细胞计数（附录 3C）。

   如果细胞生长良好，长成片，预计的细胞得率应该为大约 2×10^7 个细胞/平板。

2. 在 $25cm^2$ 组织培养瓶中加入 10ml 不含抗生素的 RPMI-10 和 5×10^6 个 J774 细胞。直立放置，37℃，5% CO_2 孵育过夜。
3. 将单核细胞增生性利斯特氏菌加入无菌 BHI 培养基中，37℃摇菌，直到 A_{600} 数值为 0.1（大约 2×10^8 个细胞/ml）。
4. 加入 1ml 上述利斯特氏菌液，感染 J774 细胞，37℃孵育 30min 后弃原来的培养基，加入 10ml 含有 5μg/ml 庆大霉素的 RPMI-10，37℃孵育 3h。弃原培养基，再加入 10ml 新鲜的含 5μg/ml 庆大霉素的 RPMI-10，孵育过夜。用 20 000rad 射线照射组织培养瓶中感染的 J774 细胞。
5. 最初的反应峰值出现，即 7～8d，分离利斯特氏菌感染的 BALB/c 小鼠脾脏（单元 2.1）。
6. 25℃，500g 离心细胞 5min，用 ACK 溶解红细胞（单元 2.1）。再次离心沉淀脾细胞，然后用含有 5μg/ml 庆大霉素的 RPMI-10 重悬细胞，用血细胞计数器进行计数（附录 3A）。

   6～8 周龄的 BALB/c 小鼠感染单核细胞增生性利斯特氏菌 7d 后，其脾细胞数应该达到 2×10^8～2.5×10^8 个细胞。

7. 在含射线灭活的利斯特氏菌感染 J774 细胞的培养瓶中加入 5×10^7～6×10^7 免疫脾细胞，用 5μg/ml 庆大霉素的 RPMI-10 调整终体积至 20ml。
8. 上述免疫细胞体外每周用感染的 J774 细胞和 3×10^6 射线（2000rad）灭活的初始（naive）脾细胞作为填充细胞（初始脾细胞，步骤 5 和 6）重复刺激，第三次后所有后继刺激物需加入大鼠脾细胞 ConA 活化的条件培养上清（含 CTL 克隆生长所需的 IL-2）和 50mmol/L α-甲基甘露糖苷。

   体外重新刺激后的 T 细胞可在 4～6d 用于 CTL 检测。ConA 活化上清液的最佳浓度需经过实验来确定，但是我们经常所用的终浓度是 10%（V/V）。

9. 用有限稀释法在 96 孔培养板中筛选获得 T 细胞克隆和亚克隆（单元 2.12），接下来用上述相同的步骤，按比例加入填充细胞，每孔所添加的总体积是 200μl。
10. 制备 BALB/c 小鼠的初始脾细胞（步骤 5 和 6），用 2000rad 射线照射。

    可选择用肽重复刺激（步骤 10～15），荷载肽的初始脾细胞作为每周刺激的刺激细胞。

11. 溶化 1mmol/L 的合成肽溶液，并稀释到 2ml 的 RPMI-10（含或不含庆大霉素）至

10^{-6}～10^{-9}mol/L（表 11.4.3），0.22μm 过滤除菌。

12. 取 30×10^6～40×10^6个照射灭活的初始脾细胞经 25℃，500*g* 离心细胞 5min 得到细胞沉淀，用肽溶液重悬细胞至 20×10^6个细胞/ml，37℃ 孵育 1h。
13. 用 10ml 含有庆大霉素的 RPMI-10 洗涤刺激细胞两遍后，用 5ml 含庆大霉素的 RPMI-10 重悬细胞，并移至直立的 25cm² 组织培养瓶中。
14. 加 5×10^7～6×10^7个用利斯特氏菌免疫的小鼠（初次感染 7d 后）脾细胞，向含荷载合成肽的刺激细胞的组织培养瓶中加入 5ml 含庆大霉素的 RPMI-10 重悬细胞，置 37℃孵育。采用有限稀释法建立 T 细胞克隆（步骤 9）。

参考文献：Cossart and Mengaud，1989；Pamer，1997

撰 稿 人：Dirk H. Busch，Sujata Vijh，and Eric G. Pamer

单元 11.5　淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒感染动物模型

注意：NIH 将人类病原体依据危险程度分类，淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）介于两个风险组之间。大部分 LCMV 属于 RG-2 类，不具有严重的感染性，而嗜中枢神经的 LCMV 属于 RG-3（感染性较强，甚至是致命的，但传播性很低）。疾病控制中心指南规定用来感染动物的 LCMV 应在 BL-2 实验室内处理（见前言）。另外特别提醒，在从感染的仓鼠分离和纯化 LCMV 时要求在 BL-3 实验室中进行试验。LCMV 在高 pH、高温（56℃）及照射下易失活。

基本方案 1　全身性感染 LCMV 小鼠模型

小鼠感染 LCMV 后的结果与所选用的病毒株、剂量和感染的方式有关。表 11.5.1 列举了常用的免疫缺陷小鼠品系、LCMV 感染后的结果和依据研究目的选用的病毒株和感染途径。表 11.5.2 展示了所选 LCMV 病毒株的特性。

表 11.5.1　淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）感染常用小鼠品系的效应

小鼠品系	缺陷	LCMV 感染结果
SCID	T/B 细胞	持久的，存活
Athymic	T/B 细胞	持久的，存活
Lpr/ Lpr	FAS	清除，存活
Perforin KO	穿孔素	持久的，过渡性免疫病理性反应死亡
CK8 KO	CD8 细胞	持久的，存活，没有 CTL 反应
β2mKO	β2 微球蛋白	持久的，存活，没有 $CD8^+$CTL 反应
CD4 KO	CD4 细胞	清除，存活，记忆性 CTL 损伤
MHC II KO	MHC II 类分子	清除，存活，记忆性 CTL 损伤
干扰素 γ KO	干扰素 γ	清除，剂量依赖性，存活
干扰素 αβ KO	干扰素 αβ	持久的，死亡
IL-4 KO	IL-4	清除，存活
IL-2 KO	IL-2	清除，特发性炎症性肠病
CD40L KO	CD40 配体	清除，存活，记忆性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 损伤

表 11.5.2 所选的淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）的特性

LCMV 株	对造血组织的趋向性	干扰素易感性	生成持久感染的能力
Armstrong	低	高	最少
WE	中等	高	↓
Traub	高	高	↓
Armstrong clone13	高	低	↓
WE docile	高	低	最多

材料（带√项目见附录 1）

已知滴度的 LCMV 病毒株（见辅助方案 1 和 2）

√PBS

适当品系小鼠，满足统计学意义所需的数量。

麻醉剂（如氯胺酮/甲苯噻嗪；附录 2D）

1ml Luer 锁紧套口注射器（一次性注射器），25G～27G 针头

1. 37℃水浴融化病毒冻存液后立即置于冰上，采用以下方法感染动物后应该依照生物安全标准舍弃不可用的病毒冻存液，不可反复冻融。

腹腔内注射感染

依照上述方法将 10^1～10^6pfu 的 LCMV 腹腔注入小鼠体内，引起除脑之外的全身性感染，但病毒通常在感染 7～10d 内被清除，大剂量注射会导致体内免疫耗竭而延迟病毒的清除。

2a. 稀释病毒溶液，注意控制注入每个小鼠体内的体积在 0.1～0.2ml。

3a. 用 1ml 注射器吸取所需量的病毒液，之后再装上 25G～27G 针头，冰上保存待用。

注意：不要用盖上针头的注射器吸病毒液，不符合安全要求。

4a. 小鼠腹膜内注射病毒液（附录 2E）。

尽管没有规定实验开始之前必须进行麻醉，但是出于安全的考虑，建议对所要操作的动物进行麻醉。

静脉注射

如果希望快速建立全身性病毒感染及建立宿主免疫抑制和持续感染，需通过静脉注射（10^1～10^5pfu）LCMV 病毒，才可引发小鼠的全身性感染。但若大于 10^5 会导致持续的感染或“耗竭”免疫反应。

2b. 稀释病毒溶液，控制注入小鼠静脉内的体积在 0.05～0.1ml。

3b. 用 1ml 注射器吸取所需量的病毒液，之后再装上 27G 针头，冰上保存待用。

4b. 小鼠静脉内注射病毒液（附录 2E）。

足垫接种和皮下注射感染

足垫接种和皮下注射的剂量和产生的结果相似。足垫接种时，只需要 10^2pfu 的 LCMV 就可引起小鼠全身性感染，病毒溶液通过局部淋巴结迅速扩散并引起较强的抗

病毒免疫反应，其特征为足垫肿胀。

2c. 稀释病毒溶液，控制注入小鼠静脉内的体积在 0.1～0.2ml（皮下）或 10～50μl（足垫）。

3c. 用 1ml 注射器吸取所需量的病毒液，之后再装上 25G～27G 针头，冰上保存待用。

4c. 小鼠足垫接种和皮下注射毒液（附录 2E）。

颅内接种

腹腔注射、静脉注射、足垫接种和皮下注射往往不产生脑内感染。然而，直接颅内接种导致大脑和脉络丛脑膜炎后，98%～100%的小鼠在感染后 6～9d 死于脉络丛脑膜炎（病毒由此而得名）。致死原因是机体产生抗 LCMV 病毒的免疫病理反应而非病毒对细胞的直接病理作用（Dixon *et al.*，1987）。对 LCMV 已产生免疫力的动物，颅内感染可以大大减少免疫病理反应，而提高动物的存活率（见基本方案 4 中 LCMV 接种）。故颅内注射的方法常用于疫苗研究及抗病毒免疫效果评估。

2d. 稀释病毒溶液，控制注入小鼠颅内最大注射体积 50μl 中含 1～50pfu 的病毒。

3d. 用 1ml 注射器吸取病毒溶液，之后再装上 27G 针头，冰上保存待用。

4d. 氯胺酮/甲苯噻嗪麻醉小鼠（附录 2D)。

5d. 注意进针深度，用刀片切割针帽，使针尖距针帽 2mm 左右，安装帽时特别注意，因为针头已沾有病毒溶液。

6d. 四指固定小鼠头部，从眼眶近背部进针 5mm 入颅内（此处为骨联合处，进针深度容易控制）慢进慢出，大约 5min 后小鼠从麻醉中苏醒过来，每天进行观察，5～9d 之内不更换饲养笼。

每一个病毒株都要仔细地测定 LD_{50} 滴度。

基本方案 2　LCMV 病毒持续感染小鼠模型

LCMV 持续感染小鼠会引起 T 细胞的免疫耐受，这种持续感染也会涉及脑，但不会引起脉络丛脑膜炎。

材料（带√项目见附录 1）

已知滴度的 LCMV 病毒株（见辅助方案 1 和 2）

√PBS

怀孕小鼠

1ml 一次性注射器，27G 针头

1. 监控怀孕小鼠直到生产。

2. 新生小鼠出生 24h 内，腹腔接种 30μl 含 10^3 pfu 病毒的 PBS 液（基本方案 1）。

3. 小鼠生长至 4 周时，用血清空斑形成试验检测小鼠血清以证实持续感染成功（见辅助方案 2）。

持续感染成熟小鼠，可使病毒通过胎盘传染给胎儿以获得持续感染的小鼠，但这样要花费大量的时间寻找符合要求的成鼠，而且喂养小鼠也需要在达到 BL-2 级的实验室中进行。另外免疫抑制的小鼠也可用来做持续感染的动物模型。

基本方案 3　T 细胞对 LCMV 免疫反应的测定

$CD8^+$ T 细胞活性通常用细胞毒性试验检测。表 11.5.3 中列举了检测 T 细胞反应的 MHCII 类抗原表位和多肽结构。对优势表位（表中用黑体表示的 AA 序列）的 CTL 反应的检测可在 LCMV 腹腔注射后 7d 进行，此时处于 CTL 反应的高峰（对 Armstrong 公司的 E-350，产生的反应高峰在第五天）。对弱势表位的检测比较困难，需要：①在体外更强的刺激产生记忆性 CTL；②感染 LCMV 的 CTL 避开免疫优势表位肽缺陷的变异体；③DNA 免疫接种采用缺失优势表位的质粒。

表 11.5.3　LCMV 病毒 T 细胞表位[a]

小鼠品系	MHC 分子	蛋白质	位置	氨基酸顺序[b]
Class I				
C57BL/6	D^b	GP	33～41	**KAVYNFATC**
	D^b	NP	396～404	**FQPQNGQFI**
	D^b	GP	276～286	**SGVENPGGYCL**
	D^b	GP	92～101	CSANNSHHYI
	K^b	NP	205～212	YTVKYPNI
	K^b	GP	33～43	KAVYNFATCGI
BALB	L^d	NP	118～126	**RPQASGVYM**[c]
	K^d	GP	99～108	HYISMGTSGL
	K^d	GP	283～291	GYCLTKWMI
	K^d	NP	314～322	PYIACRTSI
Class II				
C57BL/6	$I\text{-}A^b$	GP	61～80	GLKGPDIYKGVYQFKSVEFD
	$I\text{-}A^b$	NP	309～328	SGEGWPYIACRTSIVGRAWE

a. 所有引用的 I 类分子表位都来自于 Armstrong 细胞株，II 类分子的表位图来自于 WE 细胞株。

b. 优势表位用黑体表示。

c. 也代表了 $H\text{-}2^q$ 和 $H\text{-}2^u$ 背景的。

检测 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞反应通常需要存在抗原呈递细胞（巨噬细胞和树突细胞）、抗原及适合的培养基条件下扩增细胞。表 11.5.4 列举了常用的抗原呈递细胞制备和检测反应细胞的方法（如细胞因子的产生、溶菌活性和增殖）。

表 11.5.4　检测 T 细胞对 LCMV 反应的方法

技术	单元
体外细胞毒性试验(CTL 试验)	单元 2.10
有限稀释试验	单元 1.3
细胞因子 ELISA 检测	第五章
细胞因子 ELISAPOT 检测	单元 5.11
胞内细胞因子染色法	单元 5.8

病毒特异性 CTL 活性的评估

LCMV 特异性的 CTL 活性可采用 5～6h ^{51}Cr 释放试验（见单元 2.10）来测定。同

时，为了检测 CTL 的识别和杀伤能力，需要准备用不同的方法表达 LCMV 抗原的同源靶细胞（并以同种靶细胞作为对照）。

1. LCMV 感染（MOI＝1；检测前 48h 进行）。
2. 用重组的疫苗病毒感染（MOI＝3；检测前 8～16h 进行）。
3. 转染表达载体的质粒（为了提高转染效率常用阳离子脂质体转染细胞毒性试验中的细胞）。
4. 用代表 LCMV 表位的多肽荷载细胞（0.02～20μg 多肽/1×10^4 个细胞）。

对照组要包括未感染的同源靶细胞、同种靶细胞和用于呈递抗原的其他细胞（如表达 LCMV 抗原的质粒 DNA 或重组疫苗）。试验中所用的脾淋巴细胞作为效应细胞与靶器细胞的比例分别为 50∶1、25∶1 和 12.5∶1，而使用 CTL 克隆或 CTL 细胞系作为效应细胞与靶细胞的比例则为 5∶1、2.5∶1 和 1∶1。另外，也可收集血液淋巴细胞，或直接收集 24 孔培养板体外培养的细胞系或克隆作为效应细胞进行检测。溶解单位（LU）定义为能杀伤 10^4 个靶细胞中 25％的效应细胞数为 1 个 LU。

计算

三个复孔的标准误不得超过 15％，培养板的清洁很重要，因为任何放射性的物质都会导致假阳性的出现。^{51}Cr 释放试验的计算方程如下：

$$\text{特异性释放量}\%=\frac{\text{总释放量}-\text{自发释放量}}{\text{总释放量}}\times100$$

基本方案 4　LCMV 疫苗效果的体内检测

材料

LCMV 储存液

小鼠（对照小鼠和 LCMV 感染小鼠；见基本方案 1）

1. 滴定病毒储存液对所用品系小鼠的 LD50，稀释病毒至 1000、200、40、8pfu/ml。感染组每组 8 只小鼠，颅内注射（见基本方案 1）50μl 各个稀释度的病毒（即 50、10、2、0.4pfu），观察小鼠 14d 的生存情况（感染后主要在第 7～9 天死亡），计算半数致死量（Reed and Muench，1938）。
2. 将小鼠分为以下几组。
   a. 免疫组：每组 8 只。
   b. 阳性对照组：腹腔注射活 LCMV 病毒至少 6 周以上的小鼠。

   这些小鼠可清除经过腹腔注射的病毒，同时获得对随后颅内注射病毒的保护性免疫。

   c. 阴性对照组：已适当接种疫苗的小鼠（即用于评价接种表达 LCMV 抗原的重组病毒疫苗和接种不表达 LCMV 抗原的重组病毒疫苗的保护效果）。腹腔注射 0.1～0.2ml 的 PBS 作为疫苗对照。
3. 试验前将 LCMV 病毒储存液用 PBS 稀释到 200～400LD_{50}/ml，小鼠颅内注射 50μl（10～20LD_{50}）的稀释病毒，每天观察小鼠，至少 14d。

阴性对照组（PBS和接种不表达LCMV抗原的重组病毒疫苗的对照）在病毒注入6～7d后出现发病体征（卷毛、弓背、活动减少），以后便迅速死亡。免疫了全LCMV病毒的小鼠很少出现发病体征，不出现死亡。

有效疫苗接种的小鼠在接种后6～7d内也出现发病症状，但将会很快清除病毒，48h内会完全缓解。避免在出现症状的阶段处理小鼠，此时小鼠得了脑膜炎，可能癫痫发作而死，导致无效的结果。

4. 可选：测量LCMV的病毒滴度（效价）（见辅助方案2）。

腹腔注射2×10^5pfu LCMV病毒4d后（见基本方案1），先前未免疫的小鼠脾脏中可测得10^6pfu LCMV，而接种过疫苗的小鼠脾脏及其他器官和体液（如肝脏、肺和血清中）的LCMV病毒滴度明显减少；而在建立了有效免疫的小鼠中，病毒很难被检测到。比较颅内接种方法，这一方法的另一优点在于，接种后4d便可获得每个小鼠的病毒滴定度、细胞毒活性及细胞因子分泌的相关信息。这可通过细胞内免疫反应的情况了解相关疫苗的抗病毒效果。

辅助方案1　LCMV病毒储存液的制备

材料（带√项目见附录1）

BHK-21细胞系（ATCC＃CCL-10）
√DMEM-10完全培养基
种子LCMV病毒株（来自Dr. M. von Herrath），用Vero细胞进行三次噬菌斑纯化
聚乙二醇6000（PEG-6000）
氯化钠（固体）
√TNE缓冲液
泛影钠-泛影葡胺-76（医用的）
$162cm^2$组织培养瓶
50ml离心管
1ml冻存管
带有GS-3转头的Sorvall离心机（或类似型号）
带有SW-41转头的Beckman超速离心机（或类似型号）
双室梯度形成仪（如Jule生物技术：http://www.hometown.aol.com/precast-gell/formers1.htm）

1. 用DMEM-10完全培养基在$162cm^2$组织培养瓶中培养BHK-21细胞，直到长满瓶底面积的80%～90%。
2. 弃培养基，每瓶加入2ml预冷的含有LCMV病毒（MOI＝0.05～0.1）的培养基。立即放入温箱中1h，每10min轻轻摇动一下。然后用20ml的DMEM-10替换原来的培养基，继续放在温箱中孵育。
3. 48h后，收集培养基到50ml无菌离心管，放于冰上。测定LCMV病毒滴度（大约10^8pfu/ml，见辅助方案2）。
4. 每个培养瓶中立刻加入20ml的新鲜DMEM-10培养基，在温箱中孵育24h。再次收

集培养基测定滴度（大约 10^7pfu/ml）。纯化病毒（步骤 5～10），或者部分分装、冻存（步骤 11）。

当需要高浓度的病毒，就需要进行病毒纯化（如增殖实验、受体结合实验及为 ELISA 实验准备抗原）。感染小鼠则通常不需要纯化病毒。

5. 每 100ml 含有病毒的培养基中，加入 7g PEG-6000 和 2.32g NaCl。摇动至 PEG 完全溶解，冰上放置 2h。
6. 4℃，17 000*g* 离心 30min，弃上清。用 2ml TNE 缓冲液重悬离心后的白色沉淀物。
7. 准备用于不连续的泛影钠-泛影葡胺-76 梯度离心的 Beckman SW-41 离心管，依次加入（从管底部向上）：

    1ml 含 50%（*V/V*）泛影钠-泛影葡胺-76 的 TNE 缓冲液
    2ml 含 30%（*V/V*）泛影钠-泛影葡胺-76 的 TNE 缓冲液
    3ml 含 10%（*V/V*）泛影钠-泛影葡胺-76 的 TNE 缓冲液
8. 小心加入 6ml 病毒溶液置于上层（如需要可每管加入一些培养基调整到精确的体积和重量）。4℃，210 000*g* 超速离心 75min。在 10%/30%分界处收集病毒，按照 1∶1 的比例溶在 TNE 缓冲液中。
9. 准备不连续的 10%～50%的泛影钠-泛影葡胺-76 梯度液（如用双室梯度仪）。每 8ml 的梯度液中加入 3～4ml 的病毒混悬液。4℃，154 000*g* 超速离心过夜（大约 16h）。收集可见的奶白的病毒带（大约在居管顶 2/3 位置）。
10. 按照 1∶1 的比例溶在 TNE 缓冲液中，4℃，154 000*g* 超速离心 30min。弃上清液，用 TNE 缓冲液重悬沉淀。
11. 在 1ml 无菌冻存管中加入 500μl 的病毒，立即放入干冰中，直到样品结冻。然后放入－70℃保存至少 24h，每一个时间点取部分进行病毒滴度测定。一旦融化就不要再次冷冻，以防止降低病毒滴度。

辅助方案 2　噬菌斑试验测定 LCMV 病毒滴度

材料（带√项目见附录 1）

Vero 76 细胞株（ATCC＃CRL-1587）
√DMEM-10 完全培养基
待测的 LCMV 病毒（见辅助方案 1）
1%琼脂糖（Seakem ME，FMC Bioproducts）：溶解在 Milli-Q 级水中，高压灭菌
√2×完全培养基 199（含有 10% FBS）
25%（*V/V*）甲醛，福尔马林稀释（37% *V/V* 甲醛）
√细胞染色液
6 孔组织培养板
50℃水浴箱

1. 在 6 孔板中用 DMEM-10 培养 Vero 76 细胞，每板大约 10^6 个细胞培养过夜（大约长满 60%）。
2. 用 1～7 标记 7 个无菌 Eppendorf 管，每管加入 900μl 的 DMEM-10。

3. 将已标定滴度的病毒冻存管置37℃水浴中1～2min融化LCMV病毒，然后立即放在冰上。1号管中加入100μl，用吸管彻底混匀（稀释度为10^{-1}）。换新的吸管从1管中吸取100μl加入到2管中。3～7管依次进行1/10稀释，每次更换吸管。
4. 用Pasteur吸管吸掉Vero 76细胞的培养基。6孔培养板的第1孔加入500μl培养基（细胞对照孔）。剩下的5孔分别加入从连续10倍稀释的3～7管病毒稀释液500μl。培养板置37℃孵育1h，每隔10min摇动一次。
5. 在感染病毒的同时，用微波炉融化1%琼脂糖，用水浴冷却到大约50℃。37℃温浴2×完全培养基199。用前迅速将两者同体积混匀，维持温度在40～44℃。
6. 1h后，弃6孔板中培养细胞上的接种培养液后，每孔中加入3ml融化的琼脂糖培养基。琼脂糖凝固（室温下大约10min）后置培养板于37℃培养箱中，继续培养4d。
7. 每孔加入1ml 25%甲醛，室温下固定2h，洗脱固定液，小心移走琼脂糖填料。
8. 加细胞染色液，染色1～2h。自来水滴水轻轻冲洗平板3～4次，直至多余染料被冲洗干净。将平板倒置于纸巾上使其干燥。
9. 计数斑点（在单层中未染色的直径1～3mm空洞），同时用每毫升的空斑形成单位（pfu/ml）计算病毒滴度，因为每孔仅含有0.5ml稀释10倍的病毒液，所以正确的病毒滴度为计算滴度的20倍。

辅助方案3　ELISA检测LCMV抗体

材料（带√项目见附录1）

　高滴度泛影钠梯度离心纯化的LCMV（见辅助方案1）

√PBS

　检测LCMV抗体用小鼠血清（或单抗）

　辣根过氧化物酶标记第二抗体（如大鼠抗小鼠免疫球蛋白）

1. 冰上融化纯化的LCMV储存液，无菌PBS稀释至2mg蛋白质/ml。
2. 96孔ELISA平板每孔加入100ml病毒稀释液，置于湿盒内室温孵化过夜。
3. 接下来的ELISA步骤（见单元1.1基本方案），包括：
   a. 阻断非特异性结合；
   b. 向平板内加样品（包括一抗）；
   c. 洗涤酶联板；
   d. 加入标记抗体（酶联二抗）；
   e. 加入低物，显色、测定。

参考文献：Oldstone *et al*. 1988；von Herrath *et al*. 1944

撰稿人：Matthias von Herrath and J. Lindsay Whitton

单元11.6　流感病毒

经过鼻腔内接种流感病毒后，小鼠可出现与人类非常相似的病征。这是一种进行性

的上下呼吸道病理变化为特征的疾病。小鼠感染流感病毒的严重程度可受病毒的毒力、机体免疫状况及感染的方式等因素影响。

注意：流感病毒具有生物安全方面的危害，使用病毒的实验应在 BL-2 级的实验室进行操作并根据指南处置病毒（见前言）。

基本方案 1　流感病毒鼻腔内感染麻醉的小鼠

这种方法可以建立所有呼吸道感染（鼻、气管、肺）。

材料

6～8 周龄小鼠（如 BALB/c）

$1\times10^2\sim1\times10^5$ $TCID_{50}$/ml 流感病毒（见辅助方案 2 和 4 滴定）

1. 安全固定 6～8 周龄小鼠（附录 2C），氯胺酮/赛拉嗪麻醉（附录 2D）。

   如果实验需要定量测定肺脏病毒滴度，应避免使用吸入麻醉剂，因为它们对纤毛的抑制作用影响病毒的清除。

2. 捏住麻醉小鼠的背部使其头部向后倾斜，鼻腔向上（目的是暴露鼻腔，使病毒更稳定地进入呼吸道）。应用移液管每侧鼻孔滴入 10μl $1\times10^2\sim1\times10^5$ $TCID_{50}$/ml 流感病毒。保持小鼠此体位 15s，使病毒进入肺内。
3. 将小鼠腹部置于温暖的地方使其恢复。

   流感病毒可在同一笼内鼠与鼠间传播。一般同一实验组的小鼠可在同一笼内饲养。应用这种方法使小鼠互相感染，同时增强了病毒的毒力（见基本方案 2）。

4. 保存一份病毒样本以确定其滴度（见辅助方案 2）。

备选方案　流感病毒鼻腔内感染未麻醉小鼠

用这种方法，最初的感染仅限于上呼吸道，病毒将于 3～5d 内播散到气管及肺。

材料见基础方案 1

1. 安全抓取和控制 6～8 周龄小鼠（附录 2D），防止其干扰操作。
2. 捏住小鼠的背项部使其头部向后倾斜，鼻腔向上（目的是暴露鼻腔，使病毒更稳定地进入鼻内）。应用移液管缓慢向两侧鼻孔滴入 $1\times10^2\sim1\times10^5$ $TCID_{50}$/ml 流感病毒 10μl ，使小鼠能将病毒充分地吸入到鼻腔内，然后再感染下一只小鼠。

   在进行鼻腔内感染时两人合作明显比一人有效，一人抓取并固定小鼠，另一人操控病原滴注。

辅助方案 1　流感病毒在鸡胚中扩增

材料

9～11d、无特异性致病原感染的鸡胚（SPAFAS 或 Hy-Vac）

5000U/5mg/ml（分别）青/链霉素溶液

1×10^3 $TCID_{50}$/ml 流感病毒原液

70%（V/V）乙醇
透光盒（Stromberg'Chick and Game Bird）
70%酒精棉球
鸡蛋打孔器（Stromberg'Chick and Game Bird）
配有 25G，5/8 in 针头注射器
黏附带
鸡蛋托盘
34～35℃孵化器，湿度为 82%
无菌尖剪刀
无菌金属刮勺
$5\frac{3}{4}$ in 巴斯德移液管，无菌带球囊
50ml 无菌圆锥管
冷冻 DPR-6000 离心机及 253 旋转子
0.45μm 滤器（可选）
1ml 冷冻管

1. 将 9～11d、无病原鸡胚放于透光盒前，根据存在健康的管道及可自由晃动的胚胎选择完整可靠鸡胚。剔除那些管道看起来干枯、模糊或胚胎固定的鸡胚。

   气囊位于鸡蛋较大的一端，看起来像一开放、干净的空腔，由一层黑膜将其与尿囊分隔，透过空腔可见到尿囊内液。

2. 观察每个鸡胚气囊的位置。在鸡蛋外面画一条线（在胚胎对面一侧的鸡蛋上）显示气囊与尿囊的边缘。
3. 用 70%酒精棉消毒标记线周围区域，用鸡蛋打孔器在气囊和尿囊分界线上向气囊内穿一孔。70%酒精棉消毒孔周围区域。
4. 用 1ml 注射器抽取 5000U/5mg/ml 青/链霉素溶液。持住注射器，尽可能将 25G 针头经过穿刺孔垂直插入尿囊，注入 0.1ml 液体后移走注射器。
5. 用相同的方法将 0.2ml 的 1×10^3 $TCID_{50}$/ml 流感病毒原液经原穿刺孔注入尿囊内，70%酒精棉擦拭鸡蛋并用 70%酒精棉覆盖穿刺孔。对每一个需要处理的鸡蛋均重复步骤 4 和 5。
6. 将鸡蛋较大一端向上，固定于 34～35℃湿度为 82%孵化器内，孵化 3d。
7. 鸡蛋孵化 72h 后，4℃冷却过夜，或－20℃冷却过 20～30min 以杀死胚胎凝固血液（不要冻结鸡蛋），储存于 4～8℃以备试验。
8. 移走酒精棉，用 70%乙醇将整个鸡蛋消毒。用无菌剪刀从穿刺孔开始在蛋壳上面剪开 2～3cm 环，在气囊上暴露尿囊膜。
9. 用无菌金属刮勺，拨开一部分尿囊膜使其紧贴于蛋壳，将带球囊的无菌 $5\frac{3}{4}$ in 巴斯德移液管尖端从蛋壳与刮勺间插入尿囊内，吸取尿囊内液（3～10ml），移入置于冰上的 50ml 无菌圆锥管内。
10. 4℃，500g 离心尿囊液 10min。收集上清置于冰上无菌玻璃管内，如果所吸取的尿

囊液并非无菌，可将收集的上清液用 0.45μm 滤器过滤。4℃储存几周或将一部分移入 1ml 冷冻管内 −70℃储藏几年。

每次生产较多量病毒液以确保每批实验用的病毒稳定一致，每个冷冻/融化循环将降低 0.5～1 个对数级的滴度。

11. 通过滴定确定血凝素单位（HAU；见辅助方案 9）和 50%培养组织感染剂量（$TCID_{50}$；见辅助方案 4）

辅助方案 2　鸡胚尿囊液内流感病毒滴度的测定

材料

5%（*V/V*）FBS 的 DMEM（DMEM-5，Clonetics）含 50μg/ml 庆大霉素，100U/ml青霉素，100μg/ml 链霉素和 2.5μg/ml 两性霉素

待检液（如组织匀浆，尿囊液；见辅助方案 1）

2.5×10⁵ MDCK 细胞（ATCC＃CCL-34；见辅助方案 3）

0.0002%（*m/V*）胰蛋白酶/DMEM 含 50μg/ml 庆大霉素，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素和 2.5μg/ml 两性霉素

新鲜配制含 0.5%（*V/V*）鸡红细胞无菌 PBS 悬液（见辅助方案 7，步骤 1～3）

已知滴度流感病毒（如 A/Port Chalmers/73，ATCC＃VR-810；A/PR/8/34，ATCC＃VR-95）

96 孔圆底组织培养用平板，带盖、无菌

多通道移液器

35℃，5%CO_2培养箱

组织匀浆器（Fisher Scientific）

1. 对每个待测样品，96 孔组织培养板 A～G 行相邻 3 列每孔加 90μl DMEM-5。H 行每孔加 100μl（阴性对照）。每个平板上包含 3 列阳性对照。
2. 对样品，A 行 3 个孔，每孔加 10μl 组织匀浆。多通道移液器混合 8～10 次，然后从每孔转移 10μl 至 B 行相应的孔内，再次混合，换掉移液器枪头后，再次转移相同剂量直至 G 行。G 行每孔移走并丢弃 10μl。对于阳性对照，加入病毒原液稀释液。
3. 加 100μl 2.5×10^5 MDCK 细胞至微滴定板所有孔内。盖上盖子，置于湿化 35℃，5%CO_2培养箱内过夜。
4. 用多通道移液器吸走培养液。为避免更换移液器枪头，从阴性对照（H 行）开始随浓度增加直至 A 行，保持移液器枪头成一直线，使它们可用于处理同一样本。
5. 加 200μl DMEM/0.0002%（*m/V*）胰蛋白酶（含抗生素）至微量板所有孔内。置于 35℃，5%CO_2培养箱内培养 4d。
6. 加 50μl PBS 配制的鸡红细胞悬液至所有孔内。4℃孵育 1h，识别并记录每个样品的凝集样式（含有病毒的孔内红细胞凝集并呈现混浊状，不含病毒的孔内红细胞沉淀于孔底）。根据公式（见辅助方案 4）计算每个样品 50%培养组织感染剂量（$TCID_{50}$）。

辅助方案 3　MDCK 细胞的长期培养

材料（带√项目见附录 1）

MDCK 细胞（ATCC＃CCL-34）

√不含 Ca^{2+}、Mg^{2+} 的 HBSS，含或不含 0.25％胰蛋白酶及 0.03％EDTA

含 5％及 10％（*V/V*）胎牛血清的 DMEM（DMEM-5，DMEM-10）同时含有 50μg/ml 庆大霉素，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素和 2.5μg/ml 两性霉素

75cm^2组织培养瓶

37℃，5％CO_2培养箱

50ml 圆锥管，无菌

1. MDCK 细胞加入含抗生素 DMEM-10 的 75cm^2组织培养瓶中，培养至细胞互相汇合。
2. 倾倒培养液并用 10ml HBSS 洗涤培养瓶两次。加 5ml 含 0.25％胰蛋白酶及 0.03％EDTA 的 HBSS。37℃ 孵育 15～20min 或直至细胞解离。加 10ml 含抗生素的 DMEM-10 并用移液管吹散细胞团。
3. 转移 2～4ml 细胞悬液至一新 75cm^2培养瓶，其中含有 16～18ml 含抗生素的 DMEM-5。将培养瓶放入 37℃，5％CO_2培养箱。2～4d 后或细胞长满时再次传代细胞。
4. 可选：将剩余的细胞转移至一无菌 50ml 离心管并于 200*g* 离心 5min。弃上清后将细胞重悬于 10ml 含抗生素的 DMEM-5 中，用台盼蓝染色（附录 3）计数活细胞同时将细胞浓度调整至 2.5×10^5个细胞/ml，用于病毒滴定（见辅助方案 4）或中和分析（见辅助方案 10）。

辅助方案 4　培养组织流感病毒感染剂量（TCID50）的测定

材料见辅助方案 2

1. 按辅助方案 2 方法滴定病毒，但稀释开始时用 10μl 病毒原液作为检测样品，另在滴定板中选 3～5 列作为稀释列。设一列培养基对照、一列细胞对照（阴性对照）。
2. 在第 5 天读取凝集滴度之前，准备一张类似表 11.6.1 的表格，A 列表示“病毒稀释”的对数。读取滴度之后，填入每种病毒稀释倍数下凝集孔与非凝集孔数量（B 列和 C 列）。
3. 确定每一稀释倍数下所有凝集孔的数量（D 列），即从最低稀释倍数（10^{-8}）到给定稀释倍数下所有凝集孔的数量之和。确定每一稀释倍数下所有非凝集孔的数量（E 列），即从最高稀释倍数（10^{-1}）到给定稀释倍数下所有非凝集孔的数量之和。
4. 计算每种稀释倍数下所有凝集孔占总孔数的比例（F 列），可通过将所有凝集孔数除以凝集孔数与非凝集孔数之和获得。将这种比例换成每种稀释倍数下的百分比数值（G 列）。
5. 确定 $TCID_{50}$所处的稀释度范围，即此种稀释度范围内所有凝集孔百分比为 50％（表 11.6.1为 10^{-6}～10^{-7}）。

表 11.6.1　计算 $TCID_{50}$ 样表

A	B	C	D	E	F	G
病毒稀释度	凝集孔	非凝集孔	累积的凝集孔（B 列总和）	累积的非凝集孔（C 列总和）	累积的凝集率 BD/(D+E)	凝集孔累积
10^{-1}	5	0	31	0	31/31	100%
10^{-2}	5	0	26	0	26/26	100%
10^{-3}	5	0	21	0	21/21	100%
10^{-4}	5	0	16	0	16/16	100%
10^{-5}	5	0	11	0	11/11	100%
10^{-6}	4	1	6	1	6/7	86%
10^{-7}	2	3	2	4	2/6	33%
10^{-8}	0	5	0	9	0/9	0%

6. 为确定 $TCID_{50}$ 先计算离散比 PD（proportion distance）：

$$PD=\frac{(\%above\ TCID_{50})-50\%}{(\%above\ TCID_{50})-(\%below\ TCID_{50})}$$

从表 11.6.1 中数据可得：

$$PD=\frac{86\%-50\%}{86\%-33\%}=0.68$$

7. 根据公式计算 $TCID_{50}$ 对数值：

（高于 $TCID_{50}$ 稀释倍数的对数值）+（PD × 稀释因子）= $TCID_{50}$ 对数值

本例 3 个数值分别为−6、0.68 和−1：

$$(-6)+[0.68\times(-1.0)]=-6.68$$

稀释终点即为 $10^{-6.68}$。这个数值的倒数表示感染单位体积的病毒效价。由于接种体积为 10μl，所以病毒效价可表示为 $10^{6.68}$ $TCID_{50}$/0.01ml 或 $10^{8.68}$ $TCID_{50}$/ml。

辅助方案 5　小鼠 50%致死剂量（MLD_{50}）和小鼠 50%感染剂量（MID_{50}）的测定

小鼠可在清醒（见备选方案）及麻醉（见基本方案 1）状态下进行鼻内接种。MLD_{50} 和 MID_{50} 的数值与小鼠的品系、鼠龄及感染前是否麻醉有关。

材料（带√项目见附录 1）

滴定用流感病毒原液（见辅助方案 4）

小鼠（如 BALB/c，6～8 周龄）

无菌 PBS 配制的 10mg/0.4mg/ml 氯胺酮/赛啦嗪麻醉液

√PBS，无菌

1. 确定分析 $TCID_{50}$ 所用流感病毒滴度（见辅助方案 2 或 4）
2. 用无菌 PBS 配制的 10mg/0.4mg/ml 氯胺酮/赛啦嗪麻醉液麻醉小鼠，每组 4 只，用 PBS 稀释的含有 0（仅为 PBS，阴性对照）、1、10^1、10^2、10^3、10^4 和 10^5 $TCID_{50}$ 的

流感病毒，各取 20μl 进行鼻内感染。

3. 感染后 2 周，从小鼠尾静脉取血（附录 2F）。采用红细胞凝集抑制分析（HAI）确定血清中存在抗流感病毒抗体（见辅助方案 8）。用 HAI 数据计算 MID_{50}。
4. 为计算 MLD_{50} 准备一张类似表 11.6.2 的表格。A 列填入接种病毒的 $TCID_{50}$ 剂量，B 列和 C 列分别填入每种剂量下死亡及存活小鼠的数量。

表 11.6.2 计算 MLD_{50} 样表

A	B	C	D	E	F	G
剂量($TCID_{50}$)	死亡	存活	累积死亡 (B列总和)	累积存活 (C列总和)	累积死亡率 (D/D+E)	累积死亡
10^5	4	0	15	0	15/15	100%
10^4	4	0	11	0	11/11	100%
10^3	3	1	7	1	7/8	88%
10^2	3	1	4	2	4/6	67%
10^1	1	3	1	5	1/6	17%
10^0	0	4	0	9	0/9	0%
nil	0	4	0	13	0/13	0%

5. 确定每种病毒剂量下所有死亡小鼠的数量（D 列），通过累加最低剂量至给定剂量各组死亡小鼠之和可得。确定每种病毒剂量下所有存活小鼠的数量（E 列），通过累加最高剂量至给定剂量各组存活小鼠之和可得。
6. 计算每种剂量下的累计死亡率（F 列），即每种剂量下所有死亡小鼠除以所有死亡及存活小鼠之和，并将此数值换算为死亡率百分数（G 列）。
7. 确定 MLD_{50} 所处稀释区间，此区间内累计死亡率百分数应为 50%（表 11.6.2 为 $10^2 \sim 10^1$）。
8. 为确定 MLD_{50}，首先确定离散比 PD（proportion distance）：

$$PD = \frac{50\% - (\%\text{mortality below } MLD_{50})}{(\%\text{mortality above } MLD_{50}) - (\%\text{mortality below } MLD_{50})}$$

对于表 11.6.2 数据：

$$PD = \frac{50\% - 17\%}{67\% - 17\%} = 0.66$$

9. 根据下面公式计算 MLD_{50}：

（低于 MLD_{50} 的 $TCID_{50}$ 的 log 对数）+（PD × 稀释因子）= MLD_{50} 的 log 对数

本例三个数值分别为：1.0、0.66 和 1

$$1.0 + (0.66 \times 1) = 1.66$$

此病毒原液的 MLD_{50} 为 $10^{1.66}$ $TCID_{50}$。

当我们检测某一特殊治疗能否降低小鼠的死亡率，我们可以令小鼠感染 5～10 倍 MLD_{50} 的剂量（本例为 $10^2 \sim 10^{2.66}$ $TCID_{50}$）。

10. 为计算 MID_{50} 准备一类似表 11.6.3 表格。A 列填入接种病毒的 $TCID_{50}$ 剂量，B 列

和C列分别填入每种剂量下感染（死亡或抗体阳性）及非感染小鼠的数量。

表 11.6.3　计算 MID_{50} 例表

A	B	C	D	E	F	G
剂量（$TCID_{50}$）	感染	未感染	累计感染	累计未感染	累计感染率	累计感染
10^5	4	0	21	0	21/21	100%
10^4	4	0	17	0	17/17	100%
10^3	4	0	13	0	13/13	100%
10^2	4	0	9	0	9/9	100%
10^1	4	0	5	0	5/5	100%
10^0	1	3	1	3	1/4	25%
nil	0	4	0	7	0/7	0%

11. 确定每种病毒剂量下所有感染小鼠的数量（D列），通过累加 0 $TCID_{50}$ 剂量至给定剂量各组感染小鼠之和可得。确定每种病毒剂量下所有非感染小鼠的数量（E列），通过累加 10^5 $TCID_{50}$ 剂量至给定剂量各组非感染小鼠之和可得。
12. 计算每种剂量下的累计感染率（F列），即每种剂量下所有感染小鼠数量（D）除以所有感染及非感染小鼠数量之和（D+E），并将此数值换算为死亡率百分数（G列）。
13. 确定 MID_{50} 所处稀释区间，此区间内累计感染率百分数应为50%（表11.6.3为 $10^1 \sim 10^0$）。
14. 为确定 MID_{50}，首先确定离散比PD：

$$PD = \frac{50\% - (\%\text{infected below } MLD_{50})}{(\%\text{infected above } MLD_{50}) - (\%\text{infected below } MLD_{50})}$$

对于表11.6.3数据：

$$PD = \frac{50\% - 25\%}{100\% - 25\%} = 0.33$$

15. 根据下面公式计算 MID_{50}：

（低于 MID_{50} 的 $TCID_{50}$ 的 log 对数）+（PD × 稀释因子）= MID_{50} 的 log 对数

本例三个数值分别为：0.0、0.33 和 1

$$0.0 + (0.33 \times 1) = 0.33$$

此病毒原液的 MID_{50} 为 $10^{0.33}$ $TCID_{50}$。

辅助方案 6　检测流感病毒滴度的小鼠肺脏制备

材料（带√项目见附录1）

8周龄流感病毒感染 BALB/c 小鼠（见基本方案1）

√冷的无菌 PBS

70%(V/V) 乙醇

16mm×125mm 聚丙烯无菌圆底螺旋盖试管

电动搅拌器

台式离心机

1ml 无菌圆锥管

1. 10^5 $TCID_{50}$（≥$100MID_{50}$）流感病毒感染 8 周龄小鼠。
2. 感染后适当时间采用氯胺酮/赛啦嗪麻醉液麻醉小鼠，无菌取肺并置于含 2ml 无菌预冷 PBS 的 16mm×125mm 聚丙烯无菌圆底螺旋盖试管内。

   如需进行组织学检查，切取一叶肺脏注入福尔马林使之膨胀，并置于福尔马林中。
3. 用无菌搅拌器，冰上匀浆肺组织。匀浆不同样本时采用 PBS 及 70%乙醇清洗研杵。煤气灯上迅速烧烤一下研杵，然后用预冷的 PBS 冲洗。
4. 台式离心机上离心肺组织匀浆 5℃，200*g* 离心 1min。将每个样品的上清等分至 2 个 1ml 无菌离心管内，储存于－70℃。

辅助方案 7　流感病毒储存液中血凝单位的测定

材料（带√项目见附录 1）

鸡血与 Alsever 液（附录 1）1∶1 混合液或其他抗凝或商业化鸡红细胞（如 Clonetics）

√无菌 PBS

PBS/0.5%（*m/V*）BSA 溶液

尿囊液内的流感病毒储存液（见辅助方案 1）

15ml 及 50ml 无菌离心管

96 孔圆底微滴定板

多通道移液器

1. 取 3ml 鸡血与 Alsever 液 1∶1 混合液于 15ml 无菌离心管内。4℃存放 30d。如应用商业化鸡红细胞则从步骤 4 开始。
2. 管内加 10ml 无菌 PBS，慢慢颠倒数次混合内容物。200*g* 离心 5min。去除上清及白细胞层。重复 2 次。
3. 第 3 次去除上清后，准备 1%鸡红细胞溶液，即于 50ml 离心管内加 0.4ml 鸡红细胞至 39.6ml 无菌 PBS 内并颠倒数次混匀。当天应用。
4. 于 96 孔圆底板中取相邻 3 列，每孔均加入 50μl 0.5%BSA 的 PBS。
5. 用 PBS 按 1∶10 稀释流感病毒原液。第 1 、2 列 A 行每孔加入 50μl 病毒稀释液并用多通道移液器混合 8～10 次（1∶20 稀释）。更换移液器枪头，A 行每孔取 50μl 溶液至 B 行同时混合 8～10 次。持续进行 2 倍稀释，即每次向下一行孔内转移 50μl 溶液，每次均应更换枪头并混匀。最后一行混匀后丢弃多余的 50μl 溶液。
6. 每孔加 50μl 0.5%BSA PBS 溶液和 50μl 1%鸡红细胞（步骤 3）。常温下放置平板 30min 以使红细胞沉降。
7. 轻轻倾斜、静置微滴定板几分钟后开始读取每孔的凝集模式。确定使红细胞完全凝集的病毒最大稀释度即为终点。

当微滴定板倾斜时，对照孔内红细胞会形成特征性的泪珠状（没有流感病毒所以没有凝集）。病毒量最大的孔形成混浊状，因为病毒交叉连接了所有的红细胞，阻止了它们沉淀。无沉淀但病毒量相对少的孔形成了部分凝集，所以沉淀并未形成泪珠状。

8. 上述终点的倒数即为血凝反应单位（HAU）数值（如最终稀释度为 1∶640，滴度即为 640HAU/5μl 样品）。取多个终点的平均数作为样品的血凝滴度。如果多个重复组的差异高于 1～2 倍稀释度，须重复滴定。

辅助方案 8　小鼠血清的血凝抑制试验（HAI）

材料

血清取自流感病毒感染小鼠
1%鸡红细胞（CRBC）PBS 悬液（见辅助方案 7，步骤 1～3）
PBS（附录 1）/0.5%（*m/V*）BSA 溶液
病毒抗原（见辅助方案 7）
56℃水浴箱
96 孔非无菌、非组织培养用圆底微滴定板
多通道移液器

1. 每个 0.5ml 离心管内加入 50μl 流感病毒感染小鼠血清（包括阳性及阴性对照血清）。56℃水浴箱孵育 30min 灭活补体。
2. 每个离心管内加入 200μl 的 1% CRBC 消除血清非特异性凝集活性。常温孵育 30min，每 10min 颠倒 1 次。
3. 孵育过程中，96 孔板 B～G 行每孔加 50μl PBS。H 行每孔加 100μl（CRBC 对照孔）。
4. 14 000r/min 离心 5s 使 CRBC 沉淀。将血清移至新离心管内。同样两列 A 行和 B 行相邻孔内加 50μl 热灭活、已吸附的血清样品。用多通道移液器混合 B 行孔内血清和稀释剂 8～10 次。吸取 50μl B 行溶液至 C 行相邻两孔内，继续 2 倍稀释直至 G 行。混合 G 行每孔内样品后，移走并丢弃 50μl 样品（使 A～G 行每孔含有等体积样品）。

   如果血清稀释度需要＞1∶640，可将一系列的稀释延长至微滴定板的其他列（第 1～11 列），可用第 12 列作 CRBC 对照。

5. 稀释流感病毒抗原直至每 50μl 含有 4HAU（见辅助方案 7）。

   作为对照，流感病毒抗原应重新滴定以确定含有 4HAU。

6. B～G 行每孔加 50μl PBS，H 行每孔加 100μl。A～B 行每孔加 50μl 病毒抗原。混合 B 行每孔的样品，然后转移 50μl 至 C 行相邻的孔。混合后持续按 1∶2 稀释直至 G 行。不要处理 H 行，此为阴性对照。
7. 除 H 行外（CRBC 对照孔），微滴定板每孔加 50μl 病毒抗原稀释液。室温孵育 30min。
8. 所有孔内加 50μl 的 1%鸡红细胞。室温孵育 30～45min。轻轻斜置微滴定板数分钟后读取凝集模式，并将样品与对照孔比较。加入 CRBC 1h 内读取所有板孔，此时 CRBC 与流感病毒反应是可逆的。

阴性对照孔（不含抗流感病毒抗体的正常小鼠血清）会出现混浊，因为流感病毒使 CRBC 完全凝集。阳性对照孔（含有已知抗流感病毒血清）出现 CRBC 沉淀类似于 H 行沉淀，因为有足够的抗流感病毒抗体可以抑制凝集反应。随着血清稀释度的增加，抗体逐渐减少，CRBC 凝集逐渐变得明显。

BSA 偶尔会引起干扰；如出现干扰，介质中可不用 BSA。

9. 将完全抑制凝集反应的最大稀释度作为每列的终点（一系列稀释度中最后一个形成 CRBC 沉淀的孔）。计算每一样品的 HAI 滴度。如果多个重复组的滴度差异高于 1～2 倍稀释度，须重新滴定。

辅助方案 9 流感病毒储存液（原液）的系列稀释

材料（带√项目见附录 1）

已滴定的流感病毒原液（见辅助方案 2 和 4）

√无菌 PBS

15ml 无菌圆锥管

注：本例我们随意选取了浓度为 $10^{7.31}$ 的病毒原液。

1. 将 $10^{7.31}$ 的病毒原液加入含 PBS 的 15ml 无菌离心管内完成 1∶20.4 的稀释（即 0.5ml 病毒原液加入至 9.7ml PBS 内），可以得到 10^6 $TCID_{50}/10\mu l$ 病毒液。
2. 取 6 只标记的 15ml 无菌圆锥管，每只含有 9ml PBS。取 1ml 10^6 $TCID_{50}$ 病毒液加入离心管内并振荡，所得样品为 10^5 $TCID_{50}$。
3. 重复上述操作得到一系列稀释浓度直至 10^2。单独加 PBS 至剩余管内（0 $TCID_{50}$）。

基本方案 2 从脾脏前体细胞获得流感病毒特异性的细胞毒 T 淋巴细胞（CTL）

材料（带√项目见附录 1）

感染流感病毒 A 的 BALB/c 小鼠 6～8 周龄（见基本方案 1 或备选方案）

感染流感病毒 B 的 BALB/c 小鼠 6～8 周龄

√无菌 PBS

10% FBS 的 IMDM（*V/V*）（IMDM-10）含有 50μg /ml 庆大霉素，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素，2.5μg/ml 两性霉素和 50μmol/L 2-巯基乙醇

尿囊液内 10^9 $TCID_{50}$ H3N2 流感病毒 A（如 B/Lee/40；ATTC＃VR-101）（见辅助方案 1，2，4）

无菌玻璃组织匀浆机（Fischer Scientific）

$75cm^2$ 组织培养瓶

15ml 和 50ml 无菌聚丙烯圆锥管

DPR-6000 离心机、253 转子或相当的台式离心机

37℃，5%CO_2 培养箱

1. 通过注射 2 倍麻醉剂量的氯胺酮/赛啦嗪麻醉液（附录 2D）处死感染流感病毒 A 的恢复期小鼠，同样方法处死感染流感病毒 B 或模拟感染的小鼠。

2. 无菌取脾脏，放入有 6ml IMDM-10 溶液的无菌玻璃匀浆管内研磨。
3. 将细胞悬液吸至 15ml 无菌离心管内，200*g* 离心 10min。弃上清，用 6ml 的 IMDM-10 溶液重悬淋巴细胞。
4. 取 4ml 淋巴细胞和 14ml IMDM-10 加入 75cm^2 组织培养瓶内。剩余的 2ml 淋巴细胞悬液 200*g* 离心 10min，去上清仅留 0.5ml。将沉淀重悬于 1ml 含 10^9 $TCID_{50}$ H3N2 型流感病毒 A 的尿囊液内。将细胞置于 37℃，5%CO_2 培养箱内孵育 1.25h，孵化期间不定时轻轻振荡细胞。
5. 200*g* 离心 10min 细胞。弃上清，用 5ml IMDM-10 重悬细胞，离心、弃上清，共洗两次。然后再次将细胞重悬于 2ml 的 IMDM-10 中。将 2ml 作为同基因刺激原的致敏脾细胞加入到含有剩余脾细胞的培养瓶内（步骤 4），那里的 CTL 前体细胞已分化为 CTL 效应细胞。置于 37℃，5%CO_2 培养箱内培养 5d。
6. 将每个培养瓶内液转移至 50ml 离心管内，200*g* 离心 10min。

   由于菌株间的差异，确切培养时间需通过预实验确定（一般 5～7d）。
7. 将沉淀重悬于 5ml IMDM-10 中。台盼蓝染色计数活细胞（附录 3C），将细胞浓度调整至 3×10^6 个细胞/ml。将这些细胞与流感病毒致敏，^{51}Cr 标记的 P815 细胞混合测量抗流感病毒 CTL 活性。

基本方案 3　收集含抗流感病毒 CTL 的肺脏细胞

材料（带√项目见附录 1）

流感病毒感染的小鼠（基本方案 1 或备选方案）
√无菌 PBS
含及不含 50U/ml 胶原酶（Sigma）的 IMDM/10%（*V*/*V*）FBS（IMDM-10）
√ACK 溶解缓冲液
60mm 无菌培养皿
无菌剪刀
37℃，5%CO_2 培养箱
组织研磨成套器件，包括无菌组织研磨钵，玻璃杵，60 目滤网（如 Sigma CD-1）
15ml 无菌离心管

1. 通过注射 2 倍麻醉剂量的氯胺酮/赛啦嗪麻醉液（附录 2D）处死流感病毒 A 感染后第 7 天小鼠。

   从小鼠肺脏获取的淋巴细胞数量因小鼠个体、品系及处死的时间而不同。BALB/c 小鼠感染后第 7 天单肺可得淋巴细胞 10^6～10^7，而感染后第 5 天可得淋巴细胞 10^5～10^6。
2. 无菌取出小鼠肺脏。无菌 PBS 冲洗并置于 60mm 无菌培养皿（含 50U/ml 胶原酶 IMDM-10 10ml）。将肺脏切成小碎块，37℃，5%CO_2 培养箱孵育 1h。
3. 将肺脏碎块移置于 60 目钢网的组织研磨钵内，研磨肺脏使其通过钢丝滤网，用 10ml IMDM-10 冲洗滤网。收集至 15ml 无菌离心管后 200*g* 离心 10min。弃上清后将沉淀重悬于 ACK 溶解缓冲液 5min。

4. 加 5ml IMDM-10 培养液，200g 离心 10min。弃上清用 IMDM-10 培养液再次冲洗沉淀、离心。弃上清将沉淀重悬于 2ml IMDM-10 中。
5. 可选：将细胞悬液通过尼龙毛柱富集效应性 T 细胞群。
6. 通过尼龙毛柱富集 T 细胞用于 Cr 释放试验，并将细胞密度调整为 1×10^6 个细胞/ml，使效应细胞与靶细胞比为 10：1。

辅助方案 10　流感病毒中和试验

材料

DMEM/5%（V/V）胎牛血清（DMEM-5，DMEM-10）同时含有 50μg/ml 庆大霉素，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素和 2.5μg/ml 两性霉素，含有及不含 2.5×10^5 MDCK 细胞（ATCC＃CCL-34）
流感病毒感染的小鼠血清（见基本方案 1 或备选方案）
已滴定的 50$TCID_{50}$/50μl 的流感病毒（见辅助方案 4）
DMEM/0.0002%（m/V）胰蛋白酶同时含有 50μg/ml 庆大霉素，100U/ml 青霉素，100μg/ml 链霉素和 2.5μg/ml 两性霉素
PBS 配置 0.5%（V/V）CRBC（Clonetics；见辅助方案 7，步骤 1～3）
无菌 96 孔圆底带盖组织培养用微孔板
多通道移液器
37℃，5%CO_2 培养箱

1. 向 96 孔圆底板 A 行各孔加 90μl 含抗生素、5%FBS 的 DMEM。B～G 行各孔加 50μl，H 行各孔加 100μl。

   如果血清稀释度要＞1：640，可增加稀释孔进行系列稀释（从第 1～11 列系列稀释后最终的稀释度为 1：10 240）。

2. A 行相邻的两孔加 10μl 血清样品。用多通道移液器混合血清及培养液 8～10 次。
3. 将 A 行每孔转移 50μl 样品至 B 行各孔并混合。重复 1：2 稀释直至 G 行。G 行各孔抛弃多余的 50μl。
4. 取两安瓿已滴定的 50$TCID_{50}$/50μl 的流感病毒，用 DMEM 稀释病毒原液 1$TCID_{50}$/50μl。通过系列稀释证实病毒滴度（见辅助方案 8）
5. 各孔加 50μl 稀释后病毒液（除用于滴定病毒原液的孔）。37℃孵育 1h。

   每孔加入病毒 50$TCID_{50}$，本实验中，如果最终病毒量为 10～100$TCID_{50}$ 则可获得相同的病毒中和滴度。

6. 取出滴定板，向各孔加入 100μl 含 2.5×10^5 个 MDCK 细胞/ml。37℃，5%CO_2 培养箱中过夜（见辅助方案 3）。
7. 用多通道移液器小心吸取各孔培养液，更换枪头吸取对照孔（H 孔）培养液。
8. 向各孔加 200μl 含抗生素 DMEM/0.0002%胰蛋白酶培养液，置于 37℃，5%CO_2 中培养 4d。
9. 向各孔加 50μl 的 0.5%CRBC/PBS 溶液，4℃孵育 1h。检查各孔是否出现凝集。将两相同样本孔均未出现 CRBC 凝集反应的血清最高稀释度的倒数作为每种血清的病

毒中和滴度。

含足够浓度抗流感病毒中和抗体的微孔内，病毒不会感染 CRBC 细胞，病毒复制也不会发生。所加入的 CRBC 细胞将会在微孔的底部形成 CRBC 细胞沉淀。可以通过 H 行得到确认。不含或未含有足够浓度抗流感病毒中和抗体的微孔内，培养 4d 后将会出现流感病毒。加入这些孔内的 CRBC 细胞将会被凝集。流感病毒交叉连接 CRBC 细胞，抑制其形成沉淀，孔内将出现混浊。

参考文献：Doherty *et al.*，1997；Gerhard *et al.*，1997

撰 稿 人：Robert Cottey，Cheryl A. Rowe，and Bradley S. Bender

［王全兴（第十一章）］

第十二章　蛋白质分离和分析

抗体专一的特异性使它们成为分离、鉴定蛋白质配体的强有力工具，这也是本章首先介绍的重点。现已有多种纯化蛋白质的方法，包括采用各种柱层析方法。原先的层析柱仅可在低压条件下使用，而现在高效液相层析（HPLC）已可耐受较高的压力。本章将详细阐述利用亲和层析分离蛋白质的过程（单元 12.1）。进行蛋白质分析时，需将此规模缩小至微量离心管中进行免疫沉淀过程（单元 12.2）。

蛋白质经分离后，最为关注的就是其纯度和分子特性，即分子质量、等电点、一级结构、蛋白质亚基组成等。电泳由于其具备优异的分辨能力而成为蛋白质纯度分析的常用方法。对于单一的蛋白质或由相同亚基组成的蛋白质，经单向凝胶电泳后检测到单一的蛋白质条带（单元 12.3），或经双向电泳后检测到单一点，则表明蛋白质是纯品。亚基间通过二硫键连接成的蛋白质在无还原剂的变性条件下电泳则显示为单一条带。如果蛋白质亚基间通过非共价连接，则在非变性条件下电泳才可获得单一蛋白质条带（单元 12.3）。因此，比较有和无还原剂存在时变性条件下和（或）相对的非变性条件下电泳结果，即可获得蛋白质纯度和亚基组成的信息。

在聚丙烯酰胺凝胶上对蛋白质进行分析的关键因素是检测手段。最常用的方法是考马斯亮蓝染色，但灵敏度较高的方法是采用银染（单元 12.4）。本章也对荧光染色法进行了阐述，它主要用于磷蛋白和糖蛋白的检测。为了确定蛋白质是否是特异性抗原，可采用相对应的抗体进行免疫印迹分析（单元 12.5）。

撰 稿 人：John E. Coligan

单元 12.1　免疫亲和层析

基本方案　可溶性或膜结合抗原的分离

材料（带√项目见附录 1）

抗体（Ab）-Sepharose（单元 12.2）

活化的（对照）Sepharose 填料，用于制备 Ab-Sepharose 填料（单元 12.2），但去除了抗体或偶联时用无关抗体替代

细胞或匀浆的组织

√TSA 溶液，冰预冷

√裂解缓冲液，冰预冷

5%（m/V）脱氧胆酸钠（Na-DOC，过滤除菌并室温保存）

√洗涤缓冲液

√Tris/Triton/NaCl 缓冲液，pH8.0 和 pH9.0，冰预冷

√1mol/L Tris · Cl，pH6.7，冰预冷

√层析柱储存液，用冰预冷

层析柱

超速离心机

quick-seal 离心管（Beckman）

注：包含抗原的所有步骤都必须在4℃冷室或冰浴中进行。

1. 制备一个 Ab-Sepharose 亲和层析柱（如 5ml；每毫升 Sepharose 填料可结合 5mg 抗体）和一个活化的（对照）Sepharose 预柱（如 5ml 的装载柱体积偶联或不偶联无关的抗体），并将它们串联起来（图 12.1.1）。为了流速最大化，最好使用比较粗的层析柱，将 Sepharose 填料填充至柱内，柱高不要超过柱直径的 2 倍。装载 5ml Sepharose 填料时可采用 10～20ml 的注射器。
2. 将 50g 细胞冰预冷 TSA 溶液悬浮成浓度为 1×10^8～5×10^8 个细胞/ml 的悬液，或每一收集细胞或匀浆的组织体积加入 1～5 倍体积的冰预冷的 TSA 溶液。并加入等体积的冰预冷的裂解缓冲液，在 4℃搅拌 1h。

   对于糖基磷脂酰肌醇（GPI）锚定蛋白质，在 20℃孵育 10min 可利于蛋白质的有效溶解。
3. 4℃，4000*g* 离心 10min 去除核酸，倒出上清液并保存。
4. 对于纯化膜抗原，加入 0.2 倍体积的 5% Na-DOC 至去除核酸的上清液中，4℃或冰浴 10min 后，转移至 quick-seal 离心管，4℃，100 000*g* 离心 1h，小心取出上清液保存备用。
5. 将 Sepharose 预柱与亲和层析柱连接好（图 12.1.1）利用下列溶液清洗这两个层析柱：

   10 柱体积（column volume，CV）洗涤缓冲液

   5CV Tris/Triton/NaCl 缓冲液，pH8.0

   5CV Tris/Triton/NaCl 缓冲液，pH9.0

   5CV 三乙醇胺溶液

   5CV 洗涤缓冲液。
6. 将步骤 3 或步骤 4 的上清液上样到预柱（保留部分样品用于下述步骤 12 的分析），并以 5CV/h 的流速流经两个层析柱。每 1/10～1/100 上样体积时，收集流穿组分。

   流速可通过静水压力调节，最大可达到 250cm/h（图 12.1.1）。通常上样两天对层析柱没影响，但如果上样持续时间较长，则表明层析柱阻塞或裂解液黏性太大，后者通常是由于存在 DNA。
7. 用 5CV 洗涤缓冲液清洗层析柱，然后关闭两个层析柱的开关，将预柱与亲和层析柱连接拆开。打开亲和层析柱的开关，使得层析柱顶端的液体排出柱体，保留柱子清洗时的所有组分。
8. 每次变换缓冲液时要按下述步骤清洗免疫亲和层析柱（步骤 9～11）。关闭层析柱的开关，打开层析柱底部的螺帽。将一注射器与缓冲液槽出口端的管道相连，抽吸出管道中的缓冲液，将管子置于另一缓冲液槽，用注射器抽吸，使得管道中充满缓冲液，然后移去注射器。将管子弯曲折叠从而调控流速，并用缓冲液清洗层析柱的内壁。打开层析柱开关，使得缓冲液流入层析柱。将底部螺帽松松地扣在层析柱上，

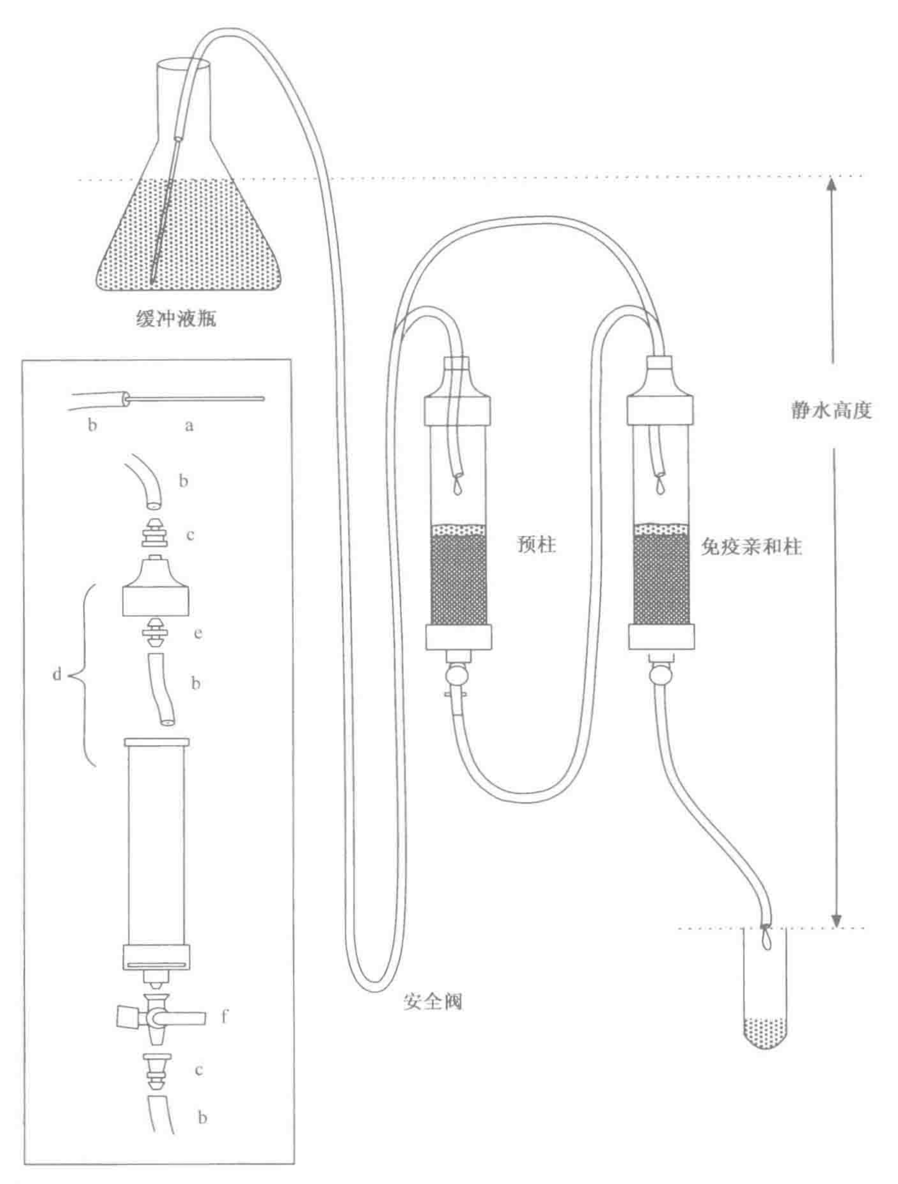


图 12.1.1 免疫亲和层析。上样过程中，两个 Sepharose 层析柱，一个 Sepharose 预柱（共价偶联或不偶联无关抗体）和一个免疫亲和层析柱（共价偶联特异性的抗体）串联后，连接到包含有样品的缓冲液槽。上样结束后，去除预柱，将安全环的管子连接到免疫亲和层析柱上。静水压力的高度为储液槽中液体液面至层析柱底部管尖之间的距离。当洗脱液槽流尽，液体流至安全环管道中时，静水压力就变为零，切记避免层析柱液体流干。将安全环管子抬高可使得残留在层析柱头上的液体流出。清洗完管道后，将安全环管子的尾部放入包含下一洗脱缓冲液的液槽中开始进行洗脱。插图：免疫亲和层析柱的图释。(a) 50μl 一次性毛细微量移液管。(b) 管子：Tygon S-54-HL 内径，0.05in i. d.，或 Tygon R-3603，1/16in i. d.（比较软的管子）。(c) 母的 Luer 接头，白色尼龙（Value Plastics），1/16in。(d) Kontes 玻璃管（Kontes 玻璃）。(e) 有倒钩的螺纹接头，聚丙烯，顶部 1/32in，底部 1/16in（Value Plastics，Series AD）。(f) Luer-lok 双通道开关（Knotes 玻璃）。

使得缓冲液流经层析柱几厘米后，旋紧螺帽，开始清洗或洗脱。

9. 用5CV的洗涤缓冲液清洗层析柱，先是Tris/Triton/NaCl缓冲液，pH8.0，然后是Tris/Triton/NaCl缓冲液，pH9.0。检测最后一次清洗的组分，从而确定非特异性结合或从一些单克隆抗体上解离的蛋白质的洗脱状况。
10. 用5CV三乙醇胺溶液洗脱抗原，收集洗脱组分，并将1体积洗脱液放入0.2体积的1mol/L Tris · Cl、pH6.7溶液中。

    理想的三乙醇胺溶液的pH可使得配体完全解离（无活性损失），这可通过用SDS-PAGE分析20μl洗脱后的层析柱填料（Ab-Sepharose）和50μl洗脱液得以确证。
11. 用5CV TSA溶液清洗层析柱。为了避免层析柱干掉，用TSA溶液4℃保存层析柱以备用。
12. 利用SDS-PAGE（单元12.3）和银染（单元12.4）分析每一50μl洗脱组分是否含有抗原。通过Ab-Sepharose利用免疫沉淀法分析0.5～1ml样品和代表性的流穿及洗涤组分，然后再进行SDS-PAGE和银染从而确定层析柱是否饱和。

    如果洗脱过程中，抗体从填料上脱落，利用protein A-Sepharose可去除洗脱液中的抗体（Ey *et al.*，1978）。即使是结合力较弱的小鼠IgG1亚群在pH8的条件下也能去除掉（M. Dustin，pers. Comm.）。

    当利用辛烷基β-D-葡糖苷或脱氧胆酸钠作为去垢剂时，可测定A_{280}值对各组分进行初步分析。

备选方案1　抗原低pH洗脱

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录1）

√磷酸钠缓冲液，pH6.3
√甘氨酸缓冲液
√1mol/L Tris · Cl，pH9.0

1. 制备层析柱和裂解液，清洗层析柱并分离抗原（见基本方案步骤1～9，用Tris/Triton/NaCl缓冲液、pH8.0彻底清洗层析柱）。

    进行酸洗脱之前需去除脱氧胆酸钠，因为脱氧胆酸钠在低pH过渡到中性pH时，会形成沉淀或胶体。
2. 用5CV的磷酸钠缓冲液、pH6.3清洗层析柱。
3. 用5CV的甘氨酸缓冲液洗脱抗原。将洗脱组分收集到含0.2倍体积的1mol/L Tris · Cl，pH9.0溶液的试管中，收集后立即混匀每一组分。
4. 分析各组分是否含有抗原（见基本方案，步骤12）。

备选方案2　用辛烷基β-D-葡糖苷洗脱抗原

附加材料（其他材料见基本方案）

辛烷基β-D-葡糖苷

1. 制备层析柱和裂解液，清洗层析柱并分离抗原（见基本方案步骤1～9，用Tris/Triton/NaCl缓冲液，pH8.0彻底清洗层析柱）。

2. 用 5CV 含 1%辛烷基 β-D-葡糖苷的 TSA 溶液洗涤层析柱。
3. 用 5CV 含 0.1%Triton X-100 替代 1%辛烷基 β-D-葡糖苷的三乙醇胺溶液洗脱抗原。
4. 收集 1CV 的洗脱液至含有 0.2CV 1mol/L Tris · Cl，pH6.7 的试管中。
5. 清洗层析柱并分析各组分（见基本方案，步骤 11～12）。

参考文献：Harlow and Lane，1988；Hjelmeland and Chrambach，1984；Johnson *et al.*，1985；Wilchek *et al.*，1984

撰稿人：Timothy A. Springer

单元 12.2　免疫沉淀

注意：当使用放射性物质时，请采用适当的防护措施以免污染实验者和实验环境。实验操作和废水处理需在指定的范围内进行，并遵循当地放射性安全部门制定的方针。

注：所有实验所需的溶液需用冰预冷，实验操作过程需在 4℃或冰浴进行。

基本方案 1　用非变性去垢剂裂解细胞制成的悬液进行免疫沉淀

图 12.2.1 概述此操作方案。

材料（带√项目见附录）

未标记或标记的细胞悬液
√PBS，冰预冷
√非变性裂解缓冲液，冰预冷
50%（*V/V*）protein A-Sepharose 填料（Sigma，Amersham Pharmacia Biotech）保存于含 0.1%（*m/V*）BSA 和 0.01%（*m/V*）叠氮钠（NaN_3）的 PBS 溶液中
特异性的多克隆抗体（抗血清或亲和层析纯化的免疫球蛋白）或单克隆抗体（腹水、细胞培养上清或纯化的免疫球蛋白）
特异性抗体的对照抗体（如免疫前血清或制备特异性多克隆抗体纯化的无关免疫球蛋白、无关腹水、杂交瘤培养上清或制备特异性单克隆抗体纯化的无关免疫球蛋白）
10%（*m/V*）BSA
洗涤缓冲液，冰预冷
转子角度固定的微量离心机（Eppendorf 5415C 或相似类型）
试管旋转器（能够来回颠倒）
连接真空抽滤装置的巴氏吸管

1. 将细胞悬液（0.5×10^7～2×10^7个细胞获得 1ml 裂解液）放入一个 15ml 或 50ml 带螺帽的锥底离心管中 4℃，400*g* 离心 5min。将试管置于冰上，用连接真空抽滤装置的巴氏吸管吸出上清液。
2. 轻拍试管底部重悬细胞。冰预冷 PBS 如步骤 1 所述清洗细胞两次，所用 PBS 的体积

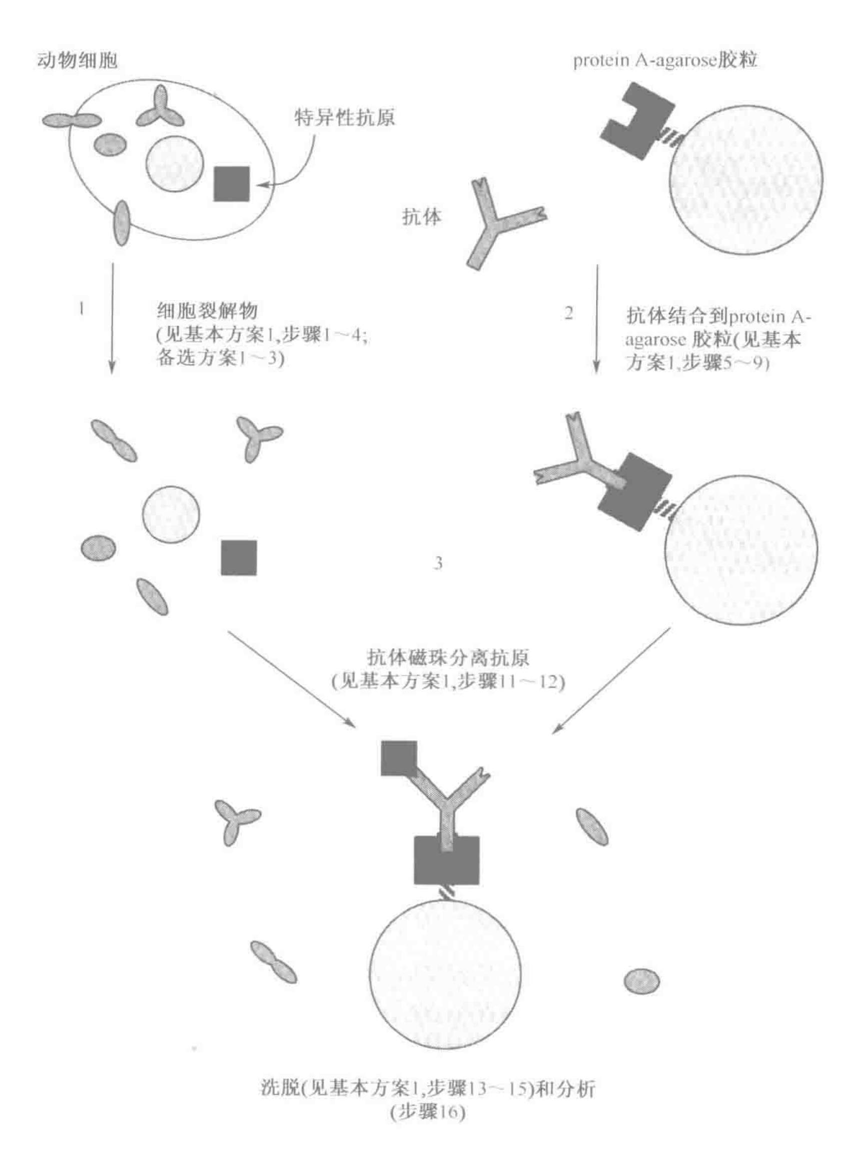


图 12.2.1 基本方案 1 中描述的免疫沉淀过程的图释。(1) 细胞裂解：用去垢剂或不用去垢剂抽提细胞使抗原溶解。为了提高免疫沉淀反应的特异性，可用 protein A-agarose 胶粒预清除细胞裂解液。(2) 抗原固定：某一特异性抗体结合至 protein A-agarose 胶粒上。(3) 抗原捕捉：可溶性的抗原通过偶联抗体的胶粒被分离。

与原先的细胞培养体积相同。

3. 加入 1ml 冰预冷的裂解缓冲液至 $0.5\times10^7\sim2\times10^7$ 个细胞，用中等速度旋转混合器轻轻旋转试管 3s，重悬细胞沉淀。将细胞悬液冰浴 15～30min 后，转移至一个 1.5ml 锥底微量离心管中。4℃，16 000g（最大转速）离心 15min 澄清裂解液。为了减少免疫沉淀的背景，如果需要，可将裂解液 10 000g 超速离心 1h。
4. 用安装了一次性吸头的可调节吸管将上清液转移至一干净的微量离心管中。不要搅动沉淀，并残留 20～40μl 上清液在离心管中。将澄清的裂解液冰浴直到预清除（步

骤 10）或加入抗体胶粒（步骤 11）。或者，−70℃冷冻储存细胞沉淀（步骤 2）或细胞抽提液直到进行免疫沉淀。

5. 在一个 1.5ml 锥底微量离心管中，将 30μl 50% protein A-Sepharose 填料，0.5ml 冰浴的 PBS 和下列定量的特异性抗体（选择一种）进行混合：

   1～5μl 多克隆抗血清

   1μg 亲和层析纯化的多克隆抗体

   0.2～1μl 含相应单克隆抗体的腹水

   1μg 纯化的单克隆抗体

   20～100μl 含相应单克隆抗体的细胞培养上清。

   如果抗体来源的种系或亚群不与 protein A（表 12.2.1）结合，那么可用 protein G 取代 protein A。

表 12.2.1 protein A 和 protein G[a,b,c] 对抗体的结合力

抗体	protein A 结合力	protein G 结合力[d]
单克隆抗体[e]		
人 IgG1	++	++
人 IgG2	++	++
人 IgG3	−	++
人 IgG4	++	++
小鼠 IgG1	+	++
小鼠 IgG2a	++	++
小鼠 IgG2b	++	++
小鼠 IgG3	++	++
大鼠 IgG1	+	+
大鼠 IgG2a	−	++
大鼠 IgG2b	−	++
大鼠 IgG2c	++	++
多克隆抗体		
鸡	−	−
驴	−	++
山羊	+	++
豚鼠	++	+
仓鼠	+	++
人	++	++
猴子	++	++
小鼠	++	++
兔子	++	++
大鼠	+	+
绵羊	+	++

a. ++，中度结合力；+，弱结合；−，不能结合。

b. 一种杂合体 protein A/G 分子结合了 protein A 和 protein G 特性，偶联到一种固相基质上，此产品可从 Pierce 获得。

c. 信息来源于 Harlow 和 Lane（1999）及 Amersham Pharmacia Biotech，Pierce 和 Jackson Immunoresearch。

d. 天然的 protein G 能与多种动物的白蛋白结合。重组构建的 protein G 与小鼠、大鼠和豚鼠的 IgG 有较好的结合力，并且排除了与血清白蛋白的结合。

e. protein A 能结合一些 IgM、IgA 和 IgE 抗体，但 protein G 仅结合 IgG。

6. 在 1.5ml 微量离心管中建立一非特异性免疫沉淀对照，将 30μl 50% protein A 填料，0.5ml 冰浴的 PBS 和合适的对照抗体（利用与特异性抗体相同的物种抗体）进行孵育：

   1～5μl 免疫前血清作为多克隆抗体血清对照；

   1μg 纯化的无关多克隆抗体（此抗体针对的抗原表位不存在于细胞裂解液中）作为纯化的多克隆抗体对照；

   0.2～1μl 包含有无关单克隆抗体的腹水（此抗体针对的抗原表位不存在于细胞裂解液中，并且此抗体与特异性抗体是相同种属和亚群的免疫球蛋白）作为包含有特异性单克隆抗体腹水的对照；

   1μg 纯化的无关单克隆抗体作为纯化的单克隆抗体的对照；

   20～100μl 包含有无关单克隆抗体的杂交瘤培养上清作为包含有特异性单克隆抗体的杂交瘤培养上清的对照。

7. 充分混合悬液。在 4℃ 试管旋转器上来回旋转孵育混合物≥1h（可持续至 24h），4℃，16 000*g*（最大转速）微量离心机离心 2s。

8. 用连接真空抽滤装置的比较精细的巴氏吸管吸出上清液（包含有未结合的抗体）。加入 1ml 非变性的裂解缓冲液至沉淀中，上下颠倒 3 或 4 次重悬沉淀。

   对于用去垢剂制备的裂解物（此方案和备选方案 1 和 2 中），加入 1ml 非变性的裂解缓冲液；对于机械破碎的裂解物（见备选方案 3 中），加入无去垢剂的裂解缓冲液。

9. 微量离心洗涤沉淀，并用非变性的裂解缓冲液重悬沉淀，吸出上清液。

10. 可选操作：在一微量离心管中，将 1ml 裂解液（来自步骤 4）与 30μl 50% protein A-Sepharose 填料混合，从而预清除裂解液。在 4℃，试管旋转器上来回旋转混合物 30min。4℃，16 000*g*（最大转速）微量离心机离心 5min。

    如果裂解液从表达免疫球蛋白的细胞如脾细胞或培养的 B 细胞制备获得，则至少需要重复 3 次预清除步骤，以确保完全去除内源性的免疫球蛋白。

11. 加入 10μl 10% BSA 溶液至装有结合了特异性抗体的填料的试管中（步骤 9），并将此混合物转移至裂解液的试管中（来自步骤 4 或步骤 10）。如果需进行平行的非特异性免疫沉淀对照，则需将裂解液分成两份，每份约 0.4ml，一份用于进行特异性抗体免疫沉淀，另一份进行非特异性的对照组实验。在 4℃，试管旋转器上充分混合悬液，并孵育 1～2h。

12. 4℃，16 000*g*（最大转速）微量离心机离心 5s。用连接真空抽滤装置的比较精细的巴氏吸管吸出上清液（包含有未结合的蛋白质）。如果需要，可将上清液 4℃ 储存 8h 或 −70℃ 储存 1 个月，然后进行抗原的免疫沉淀实验或上清液总蛋白质的分析实验。

    为了再利用裂解液，用安装了一次性吸头的可调节吸管将上清液小心吸出。进行再次免疫沉淀实验前，用 protein A-Sepharose（如步骤 10 所述）预吸附裂解液，以便去除在进行第一次免疫沉淀过程中解离出来的抗体。

13. 加入 1ml 冰预冷的洗涤缓冲液至沉淀，盖上试管盖，上下颠倒试管 3 或 4 次重悬填料。4℃，16 000*g*（最大转速）微量离心机离心 2s。吸出上清液，残留 20μl 上清液

在试管中。

14. 至少清洗沉淀 3 次，每次清洗时需将样品冰浴 3～5min。
15. 用 1ml PBS 至少清洗沉淀 1 次，用巴氏吸管或安装了一次性吸头的可调节吸管将上清液完全吸出，保留 15μl 包含有结合了抗原的沉淀。如果需要，－20℃储存。
16. 进行单向电泳（单元 12.3）、双向电泳或免疫印迹（单元 12.5）分析免疫沉淀物。

参考本单元末表 12.2.2 检查故障原因及疑难解答。

备选方案 1　用含非变性去垢剂溶液裂解的贴壁细胞进行免疫沉淀

附加材料（其他材料见基本方案 1）

未标记或标记的在细胞培养板上的单层细胞
橡胶细胞刮棒

1. 冰预冷 PBS 洗涤黏附在细胞培养板上的细胞两遍，用连接真空抽滤装置的巴氏吸管吸出 PBS。
2. 将细胞培养板冰浴，并加入冰预冷裂解缓冲液（如 100mm 直径的培养板加入 1ml 裂解液）。
3. 用橡胶细胞刮棒将细胞刮下，并用安装了一次性吸头的可调节吸管将细胞悬液转移至 1.5ml 锥底微量离心管中，轻轻旋转 3s 后，将试管冰浴 15～30min。
4. 澄清裂解液后进行免疫沉淀（见基本方案 1，步骤 4～16 ）。

备选方案 2　用含变性去垢剂裂解液裂解的细胞进行免疫沉淀

此方案仅采用能与变性蛋白质反应的抗体进行可溶性蛋白质的免疫沉淀。

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

√变性裂解缓冲液
设置在 95℃的加热器（Eppendorf 热混合器 5436 或相似类型）
连接 25G 针头的 1ml 注射器

1. 收集悬浮培养的细胞（见基本方案 1，步骤 1～2），将其冰浴。
2. 每 0.5×10^7～2×10^7 个细胞加入 100μl 变性裂解缓冲液，最大速度旋转试管 2～3s 后重悬细胞，并将细胞悬液转移至 1.5ml 锥底微量离心管中，在 95℃加热器中加热样品 5min。
3. 用 0.9ml 非变性的裂解缓冲液稀释悬液，小心混合样品。将细胞悬液通过连接 25G 针头的 1ml 的注射器 5～10 次，直至溶液黏性降低，从而剪切 DNA。
4. 将悬液冰浴 5min。
5. 澄清裂解液后进行免疫沉淀（见基本方案 1，步骤 4～16 ）。

备选方案 3　用无去垢剂裂解液裂解的细胞进行免疫沉淀

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

√无去垢剂的裂解缓冲液

√10mmol/L Tris · Cl，pH7.4（备选）

连接 25G 针头的 3ml 注射器

1. 收集细胞悬液并清洗细胞（见基本方案 1，步骤 1～2）。
2. 每 0.5×10^7～2×10^7 个细胞沉淀加入 1ml 冰预冷无去垢剂的裂解缓冲液。用中等速度的旋转混合器小心旋转 3s 重悬细胞。
3. 备选：如果细胞能够承受机械破碎，则在机械破碎前用低渗溶液（10mmol/L Tris · Cl，pH7.4），4℃溶胀细胞 10min。
4. 将细胞悬液快速通过连接 25G 针头的 3ml 注射器 15～20 次以破碎细胞，切记避免溶液飞溅和起泡。
5. 澄清裂解液后进行免疫沉淀（见基本方案 1，步骤 4～16）。

备选方案 4　用抗体-Sepharose 进行免疫沉淀

此方案依赖于蛋白质抗原与共价结合到 Sepharose 上的抗原特异性单克隆（或多克隆）抗体形成不溶的免疫复合物（图 12.2.2）。

材料（带√项目见附录 1）

未标记的细胞，表面标记的细胞（如用 ^{125}I 或生物素标记），或生物合成的 ^{35}S、^{3}H、^{14}C 标记的细胞

√Triton X-100 裂解缓冲液

√稀释缓冲液

抗体（Ab）-Sepharose（见辅助方案 1）

活化的淬灭（对照）Sepharose，用于制备 Ab-Sepharose（见辅助方案 1），但去除了抗体或偶联时用无关抗体替代

√TSA 溶液

√0.05mol/L Tris · Cl，pH6.8

√2×SDS 样品缓冲液

1. 用 Triton X-100 裂解缓冲液 4℃孵育细胞（5×10^7 个细胞/ml）1h。
2. 3000*g* 离心裂解液 10min，去除核酸并保留上清液。
3. 100 000*g* 离心上清液 1h，保留上清液。切记放射性标记物的半衰期，确保上清液在几天内使用完毕，否则需要将其储存于－70℃。要避免上清液的反复冻融。
4. 每 200μl 上清液中加入 10μl 活化的淬灭（对照）Sepharose 进行同一批次上清液的预清除。定轨摇床室温振荡 2h 或 4℃振荡过夜后，200*g* 离心 1min 并储存上清液。
5. 室温下用 Triton X-100 裂解缓冲液预包被 1.5ml 微量离心管 10min，以减少蛋白质吸附。吸去包被溶液。
6. 在预包被的微量离心管中加入 10^5～10^6 cpm 包含有放射性标记抗原（^{125}I 或 ^{35}S）的上清液（来自步骤 4），并用稀释缓冲液将终体积定容至 200μl。对于未行放射性标记的样品，则加入 0.2～1ml 的预清除裂解液。
7. 加入 10μl 的 1∶1 Ab-Sepharose/稀释缓冲液，4℃定轨摇床振荡 1.5h。
8. 用 1ml 下列缓冲液洗涤 Ab-Sepharose。每次清洗后，200*g* 离心 1min 或微量离心 5s。

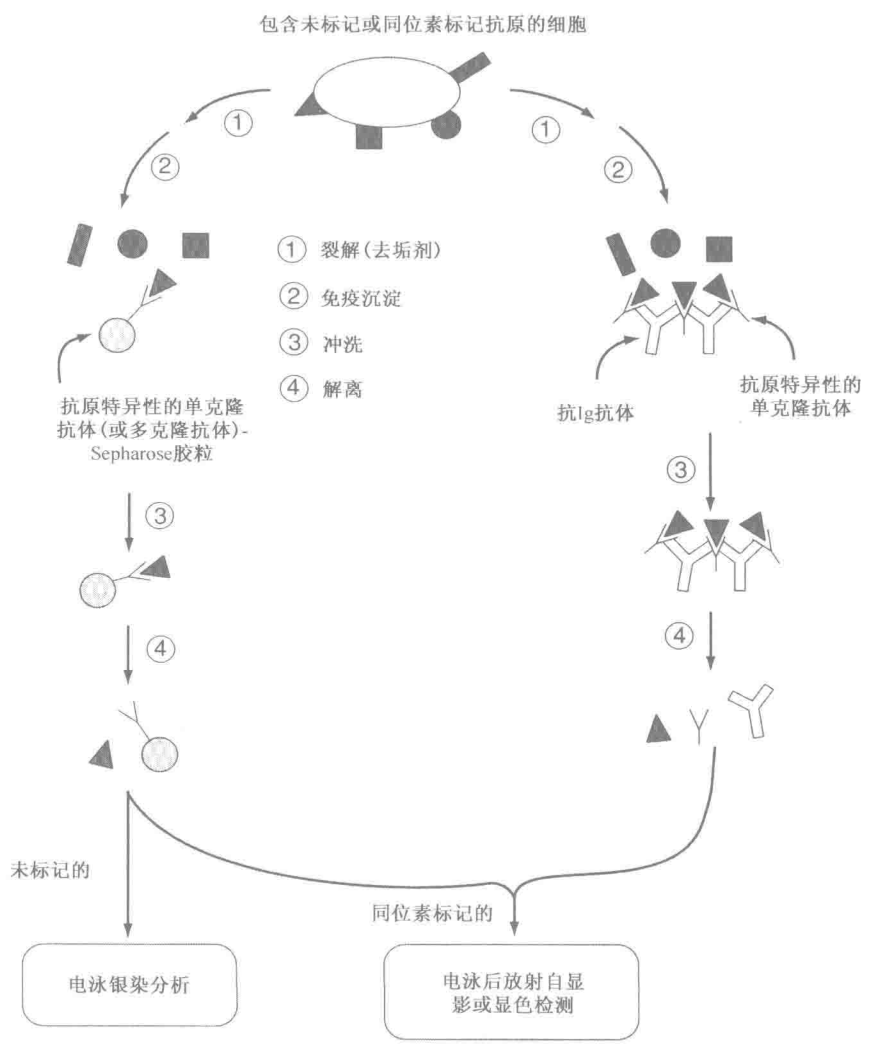


图 12.2.2　利用 Ab-Sepharose（左边，参考备选方案 4）或抗 Ig 血清（右边，参考备选方案 5）进行免疫沉淀的图释。①细胞裂解。②利用共价偶联了特异性抗体的 Sepharose（左边）或利用与抗 Ig 血清结合的特异性抗体（右边）进行免疫沉淀。③清洗。④在样品缓冲液中抗原-抗体复合物解离以便进行电泳。

然后，用比较精细的巴氏吸管小心吸出上清液，并残留 10μl 液体在试管中。第四次清洗后，将管壁上残留的液体再次离心下来，吸出上清液并残留 10μl 液体在沉淀上。

稀释缓冲液

TSA 溶液

0.05mol/L Tris · Cl，pH6.8。

9. 加入 20～50μl 2×SDS 样品缓冲液。因为样品缓冲液密度比稀释缓冲液较高，所以它将沉降至 Sepharose 下面；不要旋转试管，因为缓冲液上面的 Sepharose 将黏附到

管壁上。小心地盖上试管盖并于100℃孵育5min。

10. 200g离心1min或微量离心5s。将上清液上样，并小心避免Sepharose进入电泳道，然后进行SDS-PAGE分析（单元12.3）。
11. 用放射性自显影检测（^{125}I）标记的蛋白质，用荧光自显影检测（^{35}S、^{14}C或^{3}H）标记的蛋白质，或用比色法或化学发光检测（生物素标记的蛋白质）。

辅助方案　抗体Sepharose的制备

材料（带√项目见附录1）

1～30mg/ml抗原特异性的单克隆抗体或多克隆抗体
0.1mol/L $NaHCO_3$/ 0.5mol/L NaCl
Sepharose CL-4B（或对于高分子质量的抗原采用Sepharose CL-2B；Amersham Pharmacia Biotech）
0.2mol/L Na_2CO_3
√溴化氰（CNBr）/乙腈
1mmol/L和0.1mmol/L HCl，冰预冷
0.05mol/L甘氨酸（乙醇胺），pH8.0
√TSA溶液
透析袋（分子质量排阻>10 000）
Whatman 1号宽滤纸
布氏漏斗
锥形过滤瓶
水泵

1. 将1～30mg/ml的抗体在4℃对0.1mol/L $NaHCO_3$/ 0.5mol/L NaCl溶液透析，透析24h，换液3次。透析溶液的体积是抗体溶液体积的500倍。4℃，100 000g离心1h，去除沉淀，保存上清液。
2. 测定上清液的A_{280}吸光值，并确定抗体的浓度（mg/ml IgG = A_{280}/1.44）。用0.1mol/L $NaHCO_3$/ 0.5mol/L NaCl溶液稀释抗体浓度至5mg/ml（或达到制备Ab-Sepharose所需的抗体浓度），4℃保存抗体溶液并测定其A_{280}吸光值以备步骤8用。
3. 将Sepharose填料放在烧杯中自然沉降，然后弃去上清液。称出所需的Sepharose填料量（估计密度=1.0）。
4. 用Whatman 1号滤纸在布氏漏斗中组装一个过滤装置，并将一个锥形过滤瓶与水泵连接，在过滤装置中用10倍体积的水清洗Sepharose填料。
5. 将Sepharose填料转移至50ml的烧杯中，加入等体积的0.2mol/L Na_2CO_3溶液。室温条件下，在通风橱里活化Sepharose，每100ml Sepharose溶液加入3.2ml CNBr/乙腈溶液（2g CNBr/100ml Sepharose）。用巴氏吸管逐滴加入CNBr/乙腈溶液1ml，并用磁力搅拌器缓慢搅拌匀浆液，持续搅拌5min。

   2～4g CNBr/100ml Sepharose能够偶联1～20mg抗体/ml Sepharose。

6. 如步骤 4 所述快速过滤 CNBr 活化的 Sepharose，抽吸至半干状态（即抽吸至 Sepharose 填料积压成堆）。先用 10 倍体积的冰预冷的 1mmol/L HCl，再用 2 倍体积的冰预冷的 0.1mmol/L HCl 清洗填料。然后用足够量的冰预冷的 0.1mmol/L HCl 水化填料，但所用液体量不要超过填料上表面。
7. 立即称取所需的填料量（估计密度＝1.0），并转移至一烧杯。然后加入等体积的溶解在 0.1mol/L $NaHCO_3$/ 0.5mol/L NaCl 中的抗体溶液（来自步骤 2）。用磁力搅拌器或旋转混合器室温缓慢搅拌 2h 或 4℃搅拌过夜。
8. 加入 0.05mol/L 甘氨酸（或乙醇胺）溶液（pH8.0）中和 Sepharose 填料上仍处于活化状态的基团，并将填料悬液自然沉降。吸出部分上清液后，离心去除残余 Sepharose填料，并测定上清液的 A_{280} 吸光值。与步骤 2 的 A_{280} 吸光值进行比较，从而确定偶联率。用 TSA 溶液储存 Ab-Sepharose 填料。

备选方案 5　用与 ANTI-Ig 结合的放射性标记的抗原进行免疫沉淀

此方案仅适用于放射性标记的或生物素标记的抗原，因为未标记的抗体会保留在免疫沉淀物中，这使得使用其他检测方法很困难。

附加材料（其他材料见备选方案 4）

正常血清
抗 Ig 血清（Zymed Laboratories）
抗原特异性的抗血清或抗原特异性的纯化的单克隆抗体或抗原特异性的杂交瘤培养上清

遵循备选方案 4 的步骤，在指定的步骤进行以下的修饰：

4a. 每 ml 放射性标记的抗原加入 2μl 正常的血清进行预清除，然后加入适量的抗 Ig 血清，4℃放置 12～18h 后，1000*g* 离心 10min，储存上清液。

正常血清是载体 Ig 的主要来源，抗 Ig 血清的量必须用放射性标记的抗原或 Ig 滴定确定。对于高效价的抗 Ig 血清，使用的量将是 20×～40×抗原特异性抗血清的量，或 2～4μl/μg 纯化的单克隆抗体，或 1/3 杂交瘤培养上清的量。

7a. 加入 1μl 抗原特异性的抗血清，3μg 抗原特异性的纯化的单克隆抗体，或抗原特异性的杂交瘤培养上清（30μl 克隆化系或未克隆化系）。混合后在 4℃放置 2h。然后加入适量的抗 Ig 血清，混合后在 4℃放置 12～18h。
8a. 如前所述，洗涤免疫沉淀物，但不要在 1000*g* 离心 7min。
9a. 加入 20～50μl 2×SDS 样品缓冲液，不要摇晃，因为免疫沉淀物将会再黏附到缓冲液面上的管壁上。小心盖上试管盖，先在 56℃孵育 1h 使得免疫沉淀物解离，然后在 100℃孵育 5min。

基本方案 2　再次捕获免疫沉淀

抗原经免疫沉淀分离后，它可从免疫沉淀物中解离出来，然后用与第一次免疫沉淀相同或不同的抗体进行再次的免疫沉淀（再次捕获）（图 12.2.3）。

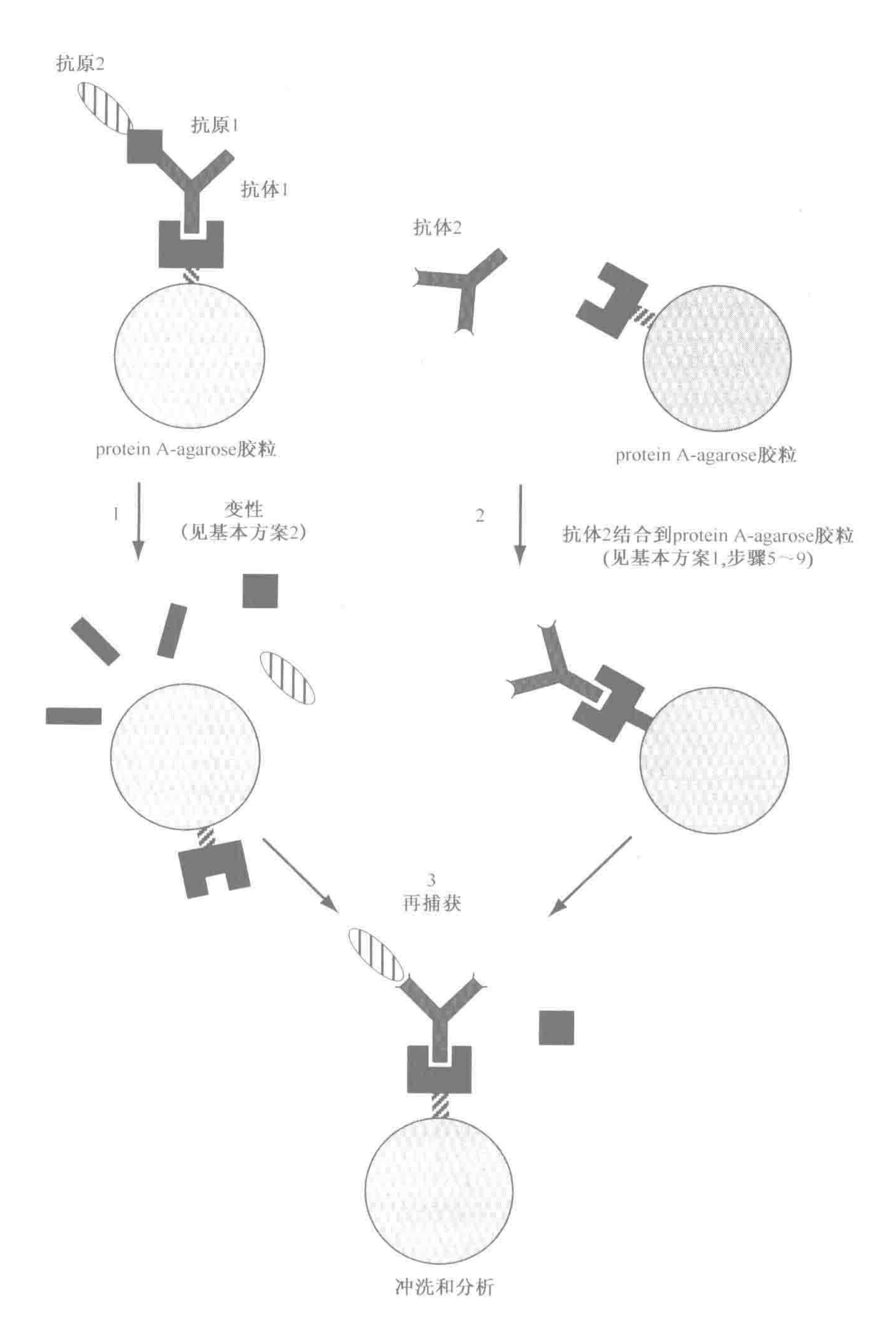


图 12.2.3　再次捕获进行免疫沉淀的图释。(1) 抗原的解离和变性：用与 protein A-agarose 胶粒结合的抗体 1 免疫沉淀抗原后，然后在 SDS 和 DTT 存在的条件下加热免疫沉淀物，使得抗原解离并变性。(2) 抗体 2 的固定：将抗体 2 结合到 protein A-agarose 胶粒上。(3) 再次捕获：抗原 2 (斜纹椭圆形) 被结合到 protein A-agarose 上的抗体 2 再次捕获。此外，抗体 1 可用来针对原先的抗原 (正方形) 进行进一步的纯化。

材料（带√项目见附录 1）

√洗脱缓冲液

结合了抗原的胶粒（见基本方案 1，步骤 15）

10%（m/V）BSA

√非变性的裂解缓冲液

设置在 95℃的加热器（Eppendorf 热混合器 5436 或相似类型）

1. 加入 50μl 洗脱缓冲液至 15μl 结合了抗原的胶粒中，旋转混合。室温孵育 5min 后，在 95℃的加热器中再孵育 5min。冷却试管至室温。
2. 加入 10μl 10% BSA 溶液，小心混合。再加入 1ml 非变性的裂解缓冲液，室温孵育 10min。
3. 澄清裂解液，进行第二次免疫沉淀（见基本方案 1，步骤 4）。

参考本单元表 12.2.2 检查故障原因及疑难解答。

表 12.2.2　免疫沉淀故障检查及疑难解答

问题	可能原因	解决方法
无特异性的放射性标记抗原条带		
放射性自显影曝光后凝胶完全是空白	细胞标记不足：放射性标记前体太少，被标记上的细胞太少，标记过程中细胞裂解/丢失，标记混合物中有大量的未标记的氨基酸，标记温度错误	用 TCA 沉淀检查标记物掺入是否正确；矫正标记过程
仅观察到非特异性条带	抗原不含有可标记的氨基酸	用另一种放射性标记的氨基酸标记细胞，或针对糖蛋白采用氘化糖
	抗原表达量太低	采用已用其他方法检测了可高表达抗原的细胞株；转染细胞以期获得抗原较高表达的细胞株
	蛋白质转换率太高以致长时程标记效果不佳	采用脉冲标记
	蛋白质转换率太低以致短时程标记效果不佳	采用长时程标记
	利用针对悬浮细胞的裂解缓冲液抽提蛋白质效果不佳	采用不同的非变性去垢剂或在变性的条件下使抗原促溶
	抗体不能沉淀	鉴定并采用能够沉淀抗原的抗体
	在天然抗原中抗原表位是不暴露的	在变性条件下抽提细胞
	抗体不能识别变性了的抗原	在非变性条件下抽提细胞
	抗体与免疫吸附剂不结合	采用不同的免疫吸附剂；采用中等结合力的抗体
	在免疫沉淀过程中抗原降解	加入有活性的蛋白酶抑制剂

续表

问题	可能原因	解决方法
非特异性条带背景太深		
在凝胶上分离的泳道背景太深	随机残留了去垢剂不能溶解的蛋白质	离心后要立即去除上清液，只留很少的一部分在沉淀中；如果要重悬沉淀，需要再次离心
所有泳道背景都很深	洗涤不充分	每次清洗时要盖上试管盖，上下颠倒几次
	蛋白质放射性标记不足	优化标记时程以获得最佳信噪比
	去垢剂不溶解的蛋白质去除不彻底	100 000*g* 离心裂解液 1h
	封闭非特异性结合的未标记蛋白质不足	提高 BSA 的浓度
	抗体含有聚集体	在抗体结合到胶粒前用最大转速微量离心抗体 15min
	抗体溶液含有非特异性抗体	采用亲和层析纯化的抗体；用丙酮抽提不表达抗原的细胞吸附抗体；对于酵母细胞，采用无效突变细胞吸附抗体
	抗体量太多	减少抗体量
	预清除不完全	用与免疫吸附剂结合的与原先抗体相同亚型的无关抗体进行预清除
	非特异性免疫沉淀蛋白质	免疫沉淀前对细胞裂解液进行分级分离（如硫酸铵沉淀、凝集素吸附或凝胶过滤）；用洗涤缓冲液清洗后，再用含 0.1% SDS 或含 0.1% SDS/0.1%脱氧胆酸钠的洗涤缓冲液清洗胶粒一遍
在免疫印迹中检测到了免疫沉淀的抗体		
在免疫印迹中观察到了完整的免疫球蛋白或免疫球蛋白重链和(或)轻链	protein A 缀合物或二抗能过识别免疫沉淀的抗体	采用共价偶联到固相基质上的抗体进行免疫沉淀；利用来源于不同种属的一抗和针对免疫印迹一抗的特异性二抗进行探索性免疫印迹实验

参考文献：Harlow and Lane，1988；Helenius *et al.*，1979；Hjelmeland and Chrambach，1984

撰 稿 人：Juan S. Bonifacino，Esteban C. Dell'Angelica and Timothy A. Springer

单元 12.3　单向蛋白质凝胶电泳

注意：所有试验都需使用蒸馏、去离子水。

基本方案

SDS 变性不连续凝胶电泳：Laemmli 凝胶法

材料（带√项目见附录 1）

Alconox 液或 RBS-35（Pierce）

分离胶和浓缩胶储存液（表 12.3.1）
饱和异丁醇
√1×Tris·Cl/SDS，pH8.8
待分析蛋白质样品（冷藏）
√1×SDS/样品缓冲液，2×SDS/样品缓冲液
标准分子质量蛋白质试剂，1×SDS 电泳缓冲液
Protean II 16cm（Bio-Rad）或 SE 600/400 16cm（Hoefer）电泳仪，包含夹子、玻璃板、夹板和缓冲液槽
0.75mm 垫片
25ml 三角抽滤瓶
真空管
真空泵
巴氏吸管
1孔、3孔、5孔、10孔、15孔或20孔的 0.75mm Teflon 梳子
25μl 或 100μl 平头注射器
恒定电流

1. 用 Alconox 液或 RBS-35 清洗玻璃板，组装2块玻璃板和2个 0.75mm 垫片，并将其固定在夹板上。
2. 根据表 12.3.1 配制所需丙烯酰胺百分浓度的分离胶储存液，并用 25ml 三角抽滤瓶抽气。

表 12.3.1 聚丙烯酰胺分离胶和浓缩胶配方[a]

分离胶

储存液	分离胶丙烯酰胺终浓度[b]/%									
	5	6	7	7.5	8	9	10	12	13	15
30%丙烯酰胺/0.8%双丙烯酰胺	2.50	3.00	3.50	3.75	4.00	4.50	5.00	6.00	6.50	7.50
4×Tris·Cl/SDS，pH8.8	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
H_2O[c]	8.75	8.25	7.75	7.50	7.25	6.75	6.25	5.25	4.75	3.75
10%过硫酸铵[d]	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

分离胶的制备

在 25ml 抽滤瓶中，将 30%丙烯酰胺/0.8%双丙烯酰胺，4×Tris·Cl/SDS，pH8.8（附录 1）和水混合，真空抽滤 10～15min，加入 10%过硫酸铵和 TEMED，温和混匀，立即使用。

浓缩胶

在 25ml 抽滤瓶中，将 0.65ml 30%丙烯酰胺/0.8%双丙烯酰胺 1.25ml 4×Tris·Cl/SDS，pH6.8（附录 1）和 3.05ml 水混合，真空抽滤 10～15min，加入 0.025ml 10%过硫酸铵和 0.005ml TEMED，温和混匀，立即使用。若不能形成坚固凝胶通常是由于过硫酸铵或 TEMED 出现问题。

a. 15ml 分离胶和 5ml 浓缩胶能满足制备一块 0.75mm×14cm×14cm 凝胶所需的量，使用 Laemmli（1970）SDS 变性不连续缓冲系统。

b. 表中的单位是毫升。

c. 所有溶液都使用蒸馏去离子水。

d. 最好是现配现用。

一般来讲，分子质量在 60～200kDa 的 SDS 变性蛋白质使用 5%的分离胶，16～70kDa 的 SDS 变性蛋白质使用 10%的分离胶，12～45kDa 的 SDS 变性蛋白质使用 15%的分离胶。

3. 加入特定量 10%过硫酸铵和 TEMED，温和混匀，立即用巴氏管将溶液沿着垫片的一边加入两块玻璃板中至液面达到 11cm 左右。用另一根巴氏管将 1cm 左右饱和异丁醇加入分离胶溶液之上，加时需温和地将饱和异丁醇沿着一边和另一边加入，切勿破坏分离胶表面。在室温下凝固 30～60min。
4. 倒去饱和异丁醇层并用 1×Tris · Cl/SDS，pH8.8 溶液冲洗。
5. 根据表 12.3.1 制备浓缩胶溶液，用巴氏管将浓缩胶溶液沿着垫片边缘缓慢加入两块玻璃板中央（避免气泡），直到液面距玻璃板顶端 1cm 左右，将一把 0.75mm Teflon 梳子插入浓缩胶溶液中，避免气泡。若有需要，用剩余的浓缩胶溶液将梳子的空隙填满，在室温下凝固 30～45min。
6. 稀释分析用蛋白质样品，将样品与 2×SDS/样品缓冲液按 1∶1（*V*/*V*）混合（置冰上），用密封的离心管将混合液在 100℃水浴加热 5min 后置冰上。若样品为沉淀物，加入 50～100μl 1×SDS/样品缓冲液溶解，100℃水浴加热 5min 后置冰上。为使样品电泳速度一致，将样品稀释成相同浓度相同体积。用 1×样品缓冲液溶解标准分子质量蛋白质作为对照。

   在 0.8cm 宽度的孔中，用考马斯亮蓝染色时，可加入 25～50μg 蛋白质混合液，或加入 1～10μg 含一种或少数几种蛋白质混合液的样品。若用银染，则所需的蛋白质量可少 10～100 倍。

   若没有将样品加热到 100℃以灭活蛋白水解酶的活性，不能将样品加入 SDS/样品缓冲液中置于室温。
7. 小心拔去梳子，避免损害孔边缘的聚丙烯酰胺凝胶，并用 1×SDS 电泳缓冲液冲洗去孔中的未聚合单体，用巴氏管将孔中填满 1×SDS 电泳缓冲液。
8. 将凝胶按说明放入上层缓冲液槽中，并在下层缓冲液槽中按推荐量倒入 1×SDS 电泳缓冲液，将凝胶从上层缓冲液槽中放入下层缓冲液槽中。将上层缓冲液槽部分注入 1×SDS电泳缓冲液以使孔中充满缓冲液。检测装置是否漏液，如有必要可重装装置。
9. 使用 25μl 或 100μl 平头注射器将蛋白质样品小心注入孔中，使孔的底部形成一样品薄层。在空余孔道中加入相同体积的 1×SDS 样品缓冲液以避免样品扩散。将上层缓冲液槽中继续加入 1×SDS 电泳缓冲液将铂电极覆盖，避免将空孔中的样品冲出孔道。
10. 将装置接通电源，使用的凝胶厚度为 0.75mm 时，可用 10mA 的恒电流进行电泳，直至溴酚蓝示踪染料进入分离胶，然后将电流上调至 15mA 进行电泳。

    标准的 16cm、0.75mm 厚度的凝胶以 4mA 电泳需时约 15h（可过夜），以 15mA 电泳需时 4～5h。要将两块 0.75mm 厚度的凝胶同时电泳或将一块 1.5mm 厚度的凝胶电泳时则将电流翻倍。当一块 1.5mm 厚度的凝胶以 30mA 电泳时可使用一个循环恒温水浴装置来控制电泳温度，以避免产生“微笑”现象（条带迁移速度不一致）。当上层缓冲液槽中的液面下降时，表示装置有漏液现象发生。

11. 当溴酚蓝示踪染料达到分离胶底部时电泳结束，关闭电源，弃去电极缓冲液，取出上层缓冲液槽和凝胶。
12. 标记凝胶方向以识别样品顺序，将凝胶从上层缓冲液槽中取出，置于吸光纸上，取出上层玻璃板。
13. 小心将凝胶从下层玻璃板中取出，在凝胶的一角切下一小块三角来标记样品方向。可用考马斯亮蓝或银染将凝胶染色（单元 12.4），电洗脱，在 PVDF 膜上电印迹以用于蛋白质顺序分析，或用于免疫印迹，也可用放射自显影检测放射标记的蛋白质。

参考文献：Hames and Rickwood，1981

撰 稿 人：Sean R. Gallagher and John A. Smith

单元 12.4 凝胶蛋白质染色

基本方案 1 考马斯亮蓝染色

检测范围为 0.3～1μg 每蛋白质条带。

材料（带√项目见附录 1）

聚丙烯酰胺凝胶（单元 12.3）
√考马斯亮蓝、银染用固定液
√考马斯亮蓝染液
√甲醇/乙酸脱色液
7%（V/V）水乙酸
Whatman 3MM 滤纸（可选）
干胶仪（可选）

1. 将聚丙烯酰胺凝胶放入塑料容器中，加入 3～5 倍胶体积的固定液，室温下摇床上振荡 2h。
2. 弃去固定液，加入考马斯亮蓝染液振荡 4h。
3. 弃去染色液，用 50ml 左右固定液清洗凝胶。
4. 弃去固定液，加入甲醇/乙酸脱色液振荡 2h。
5. 弃去脱色液，加入新鲜脱色液继续脱色，直至凝胶背景和条带清晰。可将凝胶储存于 7%水乙酸中，或者储存于含水密封塑料袋中，4℃可储存一年左右。
6. 若有需要，可将凝胶拍照。
7. 若有需要，制成干胶可永久保存凝胶。将凝胶置于两张 Whatman 3MM 滤纸上并用塑料纸覆盖，在 80℃干胶仪中干燥 1～2h。

基本方案 2 银染

可检测范围为 2～5ng 每蛋白质条带。

材料（带√项目见附录 1）

聚丙烯酰胺凝胶（单元 12.3）
√考马斯亮蓝、银染用固定液
√甲醇/乙酸脱色液
10%（V/V）戊二醛溶液（从 50%储存液现配；Kodak）
√硝酸银溶液
√显色液
Kodak 快速固定液 A
Whatman 3MM 滤纸（可选）
干胶仪（可选）
注：操作时戴好手套，避免指纹留于凝胶上。

1. 将凝胶放入塑料容器中并加入 5 倍胶体积的固定液，室温下摇床上缓慢振荡 30min 以上。
2. 弃去固定液，加入 5 倍胶体积的甲醇/乙酸脱色液固定凝胶，缓慢振荡 60min 以上。
3. 弃去脱色液，加入 5 倍胶体积的 10%戊二醛溶液，在通风橱中缓慢振荡 30min。
   注意：戴手套并在通风橱中操作。
4. 弃去戊二醛溶液，用水清洗凝胶 4 次以上，每次水洗时间 30min 以上，最好最后一次能清洗过夜。
5. 弃去洗液，用 5 倍胶体积的硝酸银溶液染色（覆盖胶）15min，剧烈振荡。
   注意：染色后马上弃去硝酸银溶液并用清水冲洗。
6. 把凝胶放入另一塑料容器中，用去离子水清洗 5 遍，每次缓慢振荡 1min。
7. 将 25ml 显色液用 500ml 水稀释，把凝胶放入另一容器中，加入足够量显色液剧烈振荡。显影至目的条带清晰而背景无色，若显色液变成棕色，可更换新鲜显色液。
8. 将凝胶放入 Kodak 快速固定液 A 中 5min，若有需要，可用浸润的棉球擦去凝胶表面残留的银。
9. 弃去快速固定液，并用清水彻底清洗凝胶（4 或 5 次）。
10. 尽快将凝胶拍照。
11. 制成干胶可长期保存（见基本方案 1，步骤 7），或者将凝胶储存于密封的塑料袋中（可保存 6～12 个月）。

基本方案 3　SYPRO Orange 或 SYPRO Red 荧光染色

检测范围为 1～2ng 每蛋白质条带。SYPRO Orange 染料推荐使用氩激光扫描器，而 SYPRO Red 染料使用绿 He-Ne 或 Nd/YAG 激光扫描器。这两种染料都需要紫外或宽带照明的激发并在有适当胶情况下，用 CCD 照相系统显色。

材料（带√项目见附录 1）

√SYPRO Orange 或 SYPRO Red 荧光染液
7.5%（V/V）乙酸

0.1%（V/V）Tween 20

1. 使用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质（单元 12.3），但电泳缓冲液中 SDS 的浓度为 0.05%，而非一般情况下的 0.1%。需用新鲜配制的 SDS 储存液来配制电泳缓冲液。
2. 将 SYPRO Orange 或 SYPRO Red 荧光染液倒入一个清洗干净的小玻璃皿中。一或两块标准大小的凝胶使用 50ml 左右染色液，大型凝胶则需 500～750ml 染色液。

   对于低浓度凝胶和小分子质量蛋白质而言，将染色液的乙酸浓度从 7.5%提高到 10%，可以使得凝胶上蛋白质有更好的保持力而不降低灵敏度。
3. 将凝胶放入染色液中，用铝箔盖住玻璃皿使凝胶避光，或者可将凝胶置于密封的塑料袋中染色，染色液的体积不变。在室温下缓慢振荡 10～60min。
4. 回收染色液并可重复使用（最多 4 次）。用 7.5%乙酸彻底冲洗凝胶（<1min），若有需要，也可将凝胶在染色液中避光过夜。
5. 将凝胶在 0.1%Tween 20 溶液中温育脱色过夜，或者更换数次 7.5%乙酸来脱色。
6. 将凝胶拍照观察。

基本方案 4　SYPRO Ruby 荧光染色

SYPRO Ruby 染料可使糖蛋白、脂蛋白、钙结合蛋白、纤维蛋白和其他难以染色的蛋白质染色，但不影响蛋白质的后续 Edman 测序或质谱分析，将凝胶置于塑料支持物上也不影响 SYPRO Ruby 染色。

材料（带√项目见附录 1）

单向或双向聚丙烯酰胺、IEF 凝胶（单元 12.3）
√双向聚丙烯酰胺凝胶 SYPRO Ruby 染色用固定液
IEF 凝胶固定液：40%（V/V）甲醇/10%（m/V）三氯乙酸
√SYPRO Ruby 蛋白质凝胶染色（分子探针）
10%（V/V）甲醇（或乙醇）/7%（V/V）乙酸
2%（V/V）甘油
旋转摇床

1a. 单向聚丙烯酰胺凝胶：直接跳至步骤 2（无需固定）。

1b. 双向聚丙烯酰胺凝胶：将聚丙烯酰胺凝胶用适量 SYPRO Ruby 染色固定液固定 30min。

   乙醇和乙酸的结合会形成乙酸乙酯，这是一种毒性物质，并且会影响蛋白质的质谱分析。

1c. IEF 凝胶：用 40%甲醇/10%三氯乙酸溶液固定 3h 后，用蒸馏水冲洗三遍，每遍 10min。

2. 将凝胶转移至适当大小的聚丙烯或 PVC 平皿中，加入未经稀释的适量 SYPRO Ruby 蛋白质凝胶染色液，连续温和振荡。如在 50r/min 转速的旋转摇床上，为使蛋白质呈现最大灵敏度，单向或双向凝胶需温育 3h 以上，而 IEF 凝胶则需温育过夜。
3. 为了降低背景荧光和增强灵敏度，将凝胶转至干净的染色皿中并用 10%甲醇（或乙醇）/7%乙酸溶液清洗 30min，聚丙烯酰胺凝胶清洗一次即可，IEF 凝胶则需清洗

三次。

4. 可选（永久保存）：将凝胶置于 2%（V/V）甘油中室温下孵育 30min，用干胶仪使染色好的凝胶干燥。
5. 将凝胶拍照并观察结果。

备选方案 1 聚丙烯酰胺凝胶上磷蛋白的特异性荧光染色

检测范围为 1～16ng 磷蛋白每条带。对于单体磷蛋白而言，信号强度与磷酸基团的数量有关，并与超过三个数量级呈线性关系。

材料（带√项目见附录 1）

包含目的蛋白的样品
甲醇，质谱级
三氯甲烷，质谱级
1×SDS 样品缓冲液
磷蛋白标准品（PeppermintStick 磷蛋白分子质量标准品，Molecular Probes；也可见表 12.4.1）
√磷蛋白凝胶用固定液
√Pro-Q Diamond 磷蛋白凝胶染色液（Molecular Probes）
√磷蛋白凝胶脱色液（也可购于 Molecular Probes 公司）
聚苯乙烯染色皿（如称重皿）
旋转摇床

1. 样品脱脂脱盐，将包含 150～300μg 蛋白质的 150μl 样品放入 1.5ml 微量离心管中。加入 600μl 甲醇、150μl 三氯甲烷和 450μl 蒸馏水，每加一步涡旋混匀，室温下 12 000r/mim 离心 5min，弃去上层相，保留界面处的白色离心盘，加入 450μl 甲醇并涡旋混匀。
2. 再次离心，弃去浮在表面的物质。用 Speedvac 蒸汽机干燥沉淀物，用标准 1×电泳样品缓冲液重悬沉淀。
3. 将样品与磷蛋白标准品、磷酸化和非磷酸化对照一起电泳（单元 12.3），为了检测到少量磷蛋白，使用和典型考马斯亮蓝染色相近的蛋白质量（见基本方案 1）。

小型凝胶

4a. 将凝胶转移至一个用 70%乙醇洗净的染色平皿中，用 100ml 左右磷蛋白小型胶用固定液（含乙酸）将凝胶浸没，在室温下温和振荡至少 30min。例如，在 50r/min 转速的旋转摇床上孵育。若有需要，重复固定，将凝胶上的 SDS 去除干净，或者固定过夜。
5a. 将凝胶在 100ml 左右水中温和振荡 10min，重复清洗一次。
6a. 将凝胶置入 50ml Pro-Q Diamond 磷蛋白凝胶染色液中避光孵育 75～120min。
7a. 在室温下将凝胶置于 80ml 磷蛋白凝胶脱色液中避光孵育 3h 左右，其中更换两次脱色液（如孵育 3 次，每次 60min）。用适当的仪器将凝胶成像并存档。

8a. 使用如 SYPRO Ruby 蛋白质凝胶染色液定量的全蛋白染液染色，以确保蛋白质的相对磷酸化状态。

表 12.4.1 商品磷酸化和非磷酸化蛋白对照品

蛋白质	分子质量/kDa	磷酸残基量	最低检测量
核黄素结合蛋白	29 200	8	1～3ng
α-酪蛋白	23 600	8	1～2ng
β-酪蛋白	24 500	5	1～2ng
卵白蛋白	45 000	2	4～8ng
胃蛋白酶	35 500	1	8～16ng
碳酸酐酶	30 000	0	不适用
牛血清白蛋白(BSA)	66 000	0	不适用

基于 555/580nm 激发的荧光染色可使用可见光扫描仪、可见光透射扫描仪或 300nm 的透射扫描仪。

大型双向聚丙烯酰胺凝胶

4b. 将凝胶转移至染色皿中，用 500ml 左右磷蛋白双向凝胶用固定液（含三氯乙酸）将凝胶浸没，室温下孵育过夜，如在 50r/min 转速的旋转摇床上振荡，更换固定液再孵育 1h 以确保将凝胶上的 SDS 除净。

5b. 用 500ml 水清洗凝胶，温和振荡 15min，重复 4 次。

6b. 将凝胶用 500ml Pro-Q Diamond 磷蛋白凝胶染色液避光温和振荡 3～4h。

7b. 在室温下，将凝胶置于 500ml 磷蛋白凝胶脱色液中避光孵育 4h，更换三次脱色液（如孵育 4 次，每次 60min）。用适当的仪器将凝胶成像并存档。

8b. 使用如 SYPRO Ruby 蛋白凝胶染色液全蛋白染液染色（见基本方案 4），或用考马斯亮蓝染色（见基本方案 1），或用银染（见基本方案 2）。

辅助方案 磷酸酪氨酸残基的特异性检测

其他材料（其他材料见备选方案 1）

磷蛋白荧光染色用凝胶（固定、染色、脱色前或后，见备选方案 1）
$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$
氩源
冰乙酸
50℃水浴摇床

1. 若凝胶没有固定和染色，则先将其固定和清洗（见备选方案 1，步骤 4a 或 4b，5a 或 5b），若凝胶已被固定、染色和脱色，则只需清洗。
2. 配制饱和氢氧化钡溶液：将 12.6g $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ 溶于 40ml 脱气蒸馏水中，混合 15～20min，室温，10 000g 离心 10min，去除未溶氢氧化钡沉淀，氩气保存。
3. 将 40ml 饱和氢氧化钡置于 50℃水浴中孵育 30min，与此同时，将 40ml 脱气蒸馏水置于 50℃水浴中预热。将所有溶液置于氩气中保存以去除空气中的二氧化碳。

4. 将预热的 40ml 氢氧化钡和 40ml 脱气蒸馏水混合后再置于 50℃水浴中，温和振荡 30min。
5. 加入 6ml 冰乙酸终止反应，清洗凝胶后染色（见备选方案 2，步骤 6a 或 6b，7a 或 7b），冰保存结果。

备选方案 2　同一块凝胶上的糖基化蛋白和非糖基化蛋白的差异性荧光染色

检测范围为 0.5ng 糖蛋白每条带，视糖基化的种类和程度而定。

材料（带√项目见附录 1）

含目的蛋白的样品
8cm×10cm SDS-聚丙烯酰胺小型凝胶（单元 12.3）
√1×SDS 样品缓冲液
Pro-Q Emerald 糖蛋白凝胶染色试剂盒（Molecular Probes）包括：
　Pro-Q Emerald 300 染色试剂（组分 A），50×浓缩液于 DMF 中保存（−20℃避光保存可使用 6 个月）
　Pro-Q Elmerald 300 染色缓冲液（组分 B，在室温下保存可使用 6 个月）
　氧化剂（组分 C）：2.5g 高碘酸［加入 250ml 3%（*V/V*）乙酸，在室温下保存可使用 6 个月］
　CandyCane 糖蛋白分子质量标准品（−20℃保存可使用 6 个月）
固定液：50%（*V/V*）甲醇
洗涤液：3%（*V/V*）冰乙酸
聚苯乙烯染色皿（如大型称重皿）
旋转摇床

注：以下操作是优化的适用于 0.5～0.75mm 厚度，8cm×10cm 小型凝胶的染色法。对于大型双向凝胶（20cm×20cm）需要更大体积的溶液盒更长的固定、染色时间，并于各步骤中有注解。

1. 用样品缓冲液稀释样品至 10～100μg/ml，在 8cm×10cm 聚丙烯酰胺凝胶各孔中上样 5～10μl。用 7.5μl 样品缓冲液稀释 0.5μl CandyCane 标准品混合液（每标准蛋白质约为 250ng），涡旋混匀，上样。大型双向凝胶（20cm×20cm）所需的样品和标准品量应翻倍，按单元 12.3 所述方法进行 SDS-PAGE 电泳。
2. 将凝胶转移至聚苯乙烯染色皿中，用 100ml（大型双向凝胶用 700ml）固定液将凝胶浸没，在室温下温和振荡（如用 50r/min 转速的旋转摇床孵育）45min（大型凝胶过夜），重复此步骤直至将凝胶上的 SDS 除尽。
3. 用 50ml（700ml）洗涤液温和振荡凝胶 10min，重复一次。
4. 用 25ml 氧化剂孵育凝胶 30min 以氧化糖类。大型双向凝胶，用相同体积的洗涤液稀释 250ml 氧化剂，并用此溶液孵育凝胶 1h。
5. 用 250ml（700ml）洗涤液清洗凝胶，温和振荡 5～10min，重复 3 或 4 次。
6. 在使用前，将 Pro-Q Elmerald 300 染色试剂 50×浓缩液 50 倍稀释于 Pro-Q Emerald 300 染色缓冲液中，用 25ml（200ml）染色液避光染色，温和振荡 90～120min

(150min)，不要染色过夜。

7. 在室温下用 50ml (700ml) 洗涤液清洗凝胶 15min，重复一次，但不能超过 2h，因为长时间置于洗涤液中会使已染色的凝胶开始脱色。
8. 将染色状态下的凝胶成像观察并保存。
9. 用 SYPRO Ruby 染色（基本方案 4）
10. 凝胶成像并观察。

参考文献：Steinberg *et al.*，1996a，b；Wilson，1983

撰 稿 人：Joachim Sasse and Sean R. Gallagher

单元 12.5 免疫印迹和免疫检测

注：在所有溶液和操作步骤中使用去离子蒸馏水，在操作滤纸、凝胶、膜时戴手套，因为手上的油脂会阻碍蛋白质转移。

基本方案 1 液体容器中的蛋白质印迹

材料（带√项目见附录 1）

待分析样品

标准分子质量蛋白质，预染型（Sigma 或 Bio-Rad）或生物素化型（Vector labs 或 Sigma）

√转移缓冲液

无粉手套

Scotch-Brite 垫片（3M）或类似海绵

Whatman 3MM 滤纸或类似物

转移膜：0.45μm 硝酸纤维素膜（Millipore 或 Schleicher&Schuell），PVDF 膜（Millipore Immobilon P），中性尼龙膜（Pall Biodyne A），或者正电荷尼龙膜（Pall Biodyne B；Bio-Rad Zetabind）

电印迹装置（EC 装置，Bio-Rad 或 Hoefer）

不可擦拭圆珠笔或软笔芯铅笔

1. 准备抗原样品，用小型或标准大小单向或双向凝胶分离蛋白质，上样时将预染的或生物素化的标准分子质量蛋白质上一道或多道。
2. 电泳结束后，拆除凝胶板去除上层胶，在室温下用适量转移缓冲液将凝胶平衡 30min。
3. 准备一个足够大的盘置放塑料转移盒，盘中注满转移缓冲液将盒覆盖。
4. 按照图 12.5.1 所示，在塑料转移盒的底部一边放置 Scotch-Brite 垫片或海绵，再放上一张用转移缓冲液润湿的与凝胶同样大小的滤纸，在滤纸上放上凝胶，用试管轻轻地在凝胶表面卷动以赶走凝胶和滤纸之间的气泡。
5. 剪一张两边缘比凝胶宽 1～2mm 的转移膜，将硝酸纤维素膜和尼龙膜呈 45°角慢慢放

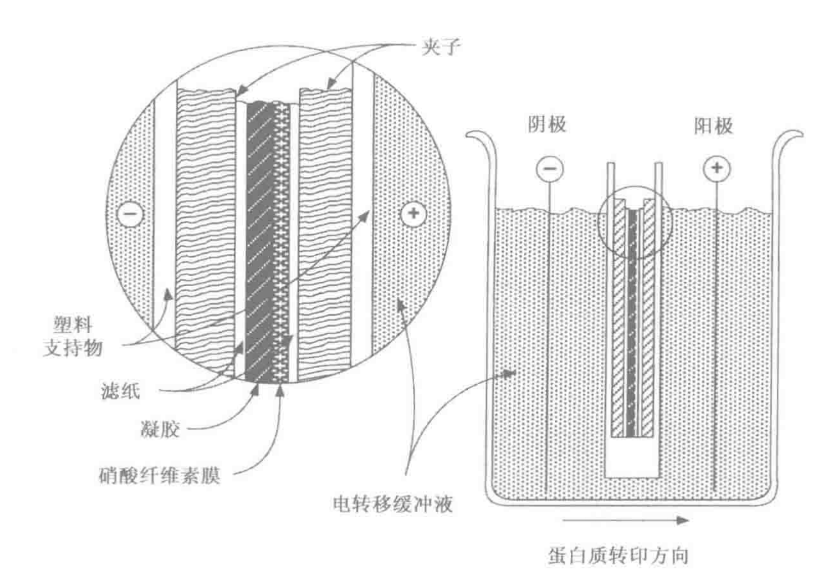


图 12.5.1　液体容器中的蛋白质印迹含蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶平放在滤纸上。在凝胶上方放置比凝胶略大 1～2mm 的硝酸纤维素滤膜或尼龙膜，再于膜上覆盖一层滤纸。然后用 Scotch-Brite 夹住上述膜层，放入一塑料支持物中。然后将上述完整的装置放入含有转移缓冲液的容器中。要转印带负电荷的蛋白质，将膜朝向阴极。要转印带正电荷的蛋白质，将膜面朝向阳极。带电荷的蛋白质可以从凝胶上电转移到滤膜上。电转移可以使用 100V、1～2h 或采用 14V 转移过夜。

入蒸馏水中，让水把膜表面全部润湿（膜放入水中时不能太快，以免有气泡形成并在膜上会形成白色斑点，阻碍蛋白质转移），将 PVDF 膜放入 100％甲醇中 1～2s，用转移缓冲液平衡 10～15min。

6. 将凝胶表面用转移缓冲液湿润，将预湿润的膜直接置于凝胶上面（阴极一面），并按步骤 4 的方法赶走气泡。
7. 将另一张 Whatman 3MM 滤纸润湿，置于膜的另一侧，赶走气泡，并在其上放置另一块 Scotch-Brite 垫片或海绵，将塑料转移盒的顶部一边放好，完成组装。
8. 将盒中注入转移缓冲液盖没电极板，但不要碰到塞子基部，将此盒放入转移装置中，膜向阴极一侧，根据阴极和阳极接上对应的电极。
9. 通电，在 100V 情况下转移需 30min～1h，并需在冷水循环中进行，或者以 14V（恒电压）在冷室转移过夜。
10. 关闭电源并拆下装置，取出膜并在膜上剪一小三角标记样品顺序或者用软笔芯铅笔或不可擦拭圆珠笔进行标记。
11. 用考马斯亮蓝以鉴定转移效率，如有必要的话，将硝酸纤维素膜或 PVDF 膜可逆染色，显示转移蛋白质（见辅助方案 1）；或者用考马斯亮蓝、印度墨水、萘酚蓝、胶体金不可逆染色。
12. 可将膜干燥后置于密封塑料袋中 4℃保存达 1 年。在进一步处理之前，将湿润的 PVDF 膜在少量 100％甲醇溶液中浸泡并用双蒸水洗去甲醇。
13. 接着做免疫探针和蛋白质可视检测（见基本方案 2、3 和备选方案 3）

备选方案 1　半干胶系统蛋白质印迹

参照图 12.5.2。

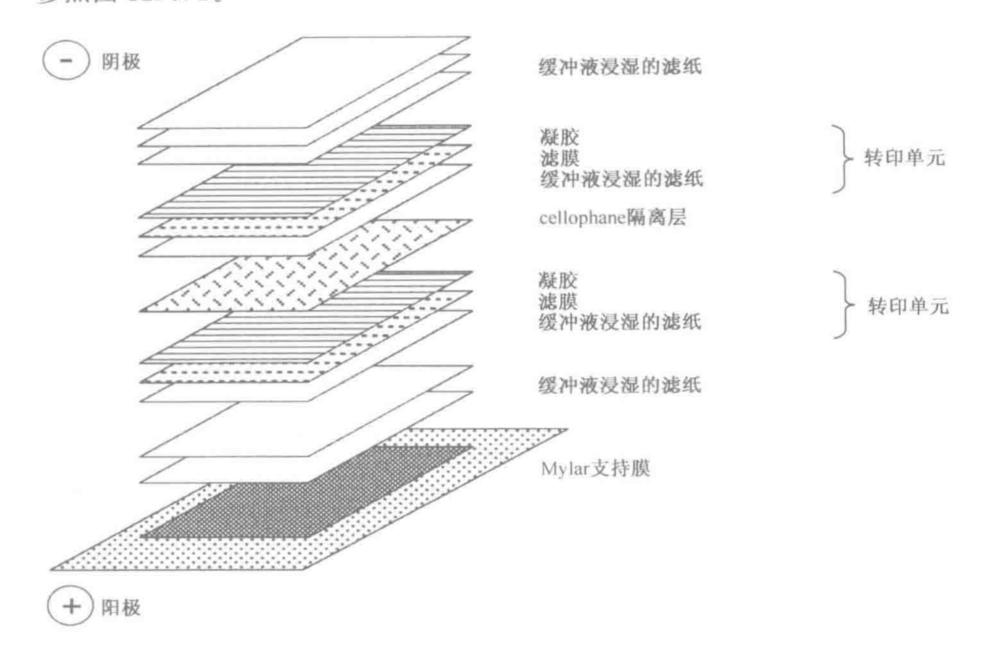


图 12.5.2　半干胶转移系统通常，下方为阴极，一次转移一块膜。在阴极上方放置一块 Mylar 衬垫，然后在其上方依次放置三层预先用转移缓冲液浸泡的滤纸、硝酸纤维素滤膜或尼龙膜、凝胶，最后再放置三层预先用转移缓冲液浸泡的滤纸。如果转移多块凝胶，每个转印单元可依上述顺序叠放，转印单元之间采用一层多孔 cellophane 膜。要转印带正电荷的蛋白质，将膜面朝向阳极。电转移采用最大电流为 0.8mA/cm^2，即对于 8cm×10cm 胶和 14cm×14cm 胶可分别采用 60mA 和 200mA 转移。

其他材料（其他材料见基本方案 1）

6 张 Whatman 3MM 滤纸或类似物，剪成与凝胶相同大小，并用转移缓冲液浸泡

半干转移装置（Hoefer，Bio-Rad 或 Sartorius 可选）

1. 准备样品，用小型或标准大小单向或双向凝胶电泳分离蛋白质。见表 12.5.1 半干印迹指示。

表 12.5.1　0.75mm 凝胶半干印迹原则

聚丙烯酰胺胶浓度(分离胶/%)	转移蛋白的分子质量(100%效率)/kDa
5～7	29～150
8～10	14～66
13～15	＜36
18～20	＜20

2. 准备转移膜（见基本方案 1，步骤 5）。
3. 拆除凝胶装置，弃去浓缩胶。
4. 将剪至与凝胶相同大小的、并用转移缓冲液湿润的三张滤纸置于阳极之上。如果蛋白质直接转移至膜上，早需使用 CAPS 缓冲液，因为甘氨酸会对这个步骤有干扰。
5. 将平衡的转移膜置于最上层滤纸上，用试管轻轻地在膜表面滚动以赶走转移膜和滤纸间的气泡。
6. 将凝胶置于膜上，用试管轻轻地在膜表面滚动以赶走凝胶和转移膜间的气泡，保证凝胶与转移膜间紧密接触。
7. 将另外三张滤纸置于凝胶上，并赶走气泡。若同时转移多块凝胶，可在各转移层中间加入一张用转移缓冲液平衡的多孔玻璃纸或透析膜。
8. 将电极置于转移层上，小心连接电源。加上恒电流（$\leqslant 0.8mA/cm^2$ 凝胶面积）开始转移膜，时间为 1h。若出现过热（温度>45℃）现象，可适当降低电流。
9. 转移结束后，关闭电源，拆去半干转移装置，取出膜用不可擦拭笔进行标记，继续染色和免疫检测（见基本方案 1，步骤 11～13）。

辅助方案 1　转移蛋白的可逆染色

为了鉴定蛋白质的转移效率，可将硝酸纤维素滤膜或 PVDF 膜进行可逆染色，而尼龙膜不可用此方法。

材料（带√项目见附录 1）

√丽春红染色液

1. 将蛋白质转移至硝酸纤维素滤膜或 PVDF 膜上，（见基本方案 1 或备选方案 1），室温下将膜置于丽春红 S 染液中 5min。
2. 用双蒸水脱色 2min，如有必要，用不可擦拭笔将标准分子质量 Marker 条带划线标记。
3. 再用双蒸水脱色 10min，使膜完全脱色。

基本方案 2　采用二抗检测的免疫探针法

材料（带√项目见附录 1）

完成蛋白质转印的膜（见基本方案 1 或备选方案 1）
√膜封闭液
目的蛋白特异性一抗
√TTBS（硝酸纤维素滤膜或 PVDF 膜）或 TBS（尼龙膜）
二抗结合物：辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的二抗（Cappel，Vector labs，Kirkegaard & Perry 或 Sigma），按需要稀释并按每份 25μl 分装冷冻保存
热密封的塑料袋或塑料孵育盒
无粉手套

塑料盒

1. (如1～3张14cm×14cm)膜置于盛有5ml封闭液的密封塑料袋中，室温下在摇床上孵育30～60min。

   若需要将膜上抗体解离并重新标记的话(见辅助方案3)，封闭液中需包含酪蛋白(碱性磷酸酶标记法)或者是使用脱脂奶粉。

2. 用封闭液稀释一抗。

   可以根据经验稀释一抗，但通常把多克隆抗体按1∶1000稀释，杂交瘤培养上清按1∶10～1∶100稀释，把含有有单克隆抗体的杂交瘤腹水按1∶1000稀释后使用，大于1∶10～1∶100倍稀释的一抗适用于碱性磷酸酶或荧光检测系统。一抗和二抗都可至少使用两次，但不能长时间保存(如在4℃不超过2d)。

3. 倒出袋中封闭液，加入5ml稀释的一抗，室温下摇床上孵育30min～1h。

   当使用塑料盒时，一抗和二抗溶液需要25～50ml，若是使用单个条带的膜条，可使用单独槽的孵育盘，每个槽中加入0.5～1ml的抗体稀释液。

4. 戴手套后将膜从塑料袋中取出，置于塑料盒中，用200ml TTBS(硝酸纤维素滤膜或PVDF膜)或TBS(尼龙膜)洗膜4次，每次摇床上孵育10～15min。

5. 用封闭液稀释二抗(HRP或AKP标记的二抗)。

   一般商品化的酶标二抗稀释1∶200～1∶2000。

6. 将膜置于新的热密封塑料袋中，加入5ml的HRP或AKP标记的二抗稀释液。室温下在摇床上孵育30min～1h。

7. 将膜取出按步骤4方法洗膜。显色观察结果(见基本方案3)。

备选方案2　亲和素-生物素化二抗的免疫探针法

附加材料(其他材料见基本方案2，带√项目见附录1)

√膜和检测用封闭液

√TTBS(硝酸纤维素滤膜或PVDF膜)或TBS(中性或带正电荷的尼龙膜)

Vectastain ABC(HRP)或ABC-AP(AP)试剂盒(Vector Labs)包含：试剂A(亲和素)，试剂B(生物素化的HRP或AP)；生物素化二抗(附使用手册)

1. 将膜放入热密封塑料袋中，加入适量的封闭液，摇床孵育平衡膜。硝酸纤维素滤膜和PVDF膜室温下孵育30～60min，尼龙膜37℃孵育2h以上。

   由于在脱脂奶粉中含有残留生物素，会干扰免疫试验，所以只能在封闭液中使用，若膜上抗体要解离并重新标记，封闭液中需含有酪蛋白(AP系统)或脱脂奶粉。

2. 用TTBS(硝酸纤维素滤膜或PVDF膜)或TBS(尼龙膜)稀释一抗，制备一抗稀释液。

   含一抗的血清通常稀释1∶100～1∶100 000。对高灵敏度生物素-亲和素系统而言，通常使用1∶1000～1∶100 000。如果使用AP或荧光检测系统，可采用更高的稀释倍数。

3. 打开密封袋，弃去封闭液，加入足够量一抗溶液将膜覆盖，室温下在摇床上匀速振

荡孵育 30min。

4. 将膜从密封袋中取出放入塑料盒中，用 TTBS（硝酸纤维素滤膜或 PVDF 膜）或 TBS（尼龙膜）洗膜三次，每次 15min 以上。TTBS 或 TBS 加入的量以完全覆盖膜为宜（如每个膜条加 5～10ml 或整块膜加 50ml）。
5. 稀释生物素化二抗溶液，将两滴生物素化二抗加入 50～100ml TTBS（硝酸纤维素滤膜或 PVDF 膜）或 TBS（尼龙膜）中。
6. 将膜转移至加有二抗的新塑料袋中，室温下缓慢振荡孵育 30min。然后按步骤 4 洗膜。
7. 当膜与二抗孵育时，准备 HRP 或 AP 亲和素-生物素结合物。将两滴 Vectastain 试剂 A 和两滴试剂 B 加入 TTBS（硝酸纤维素滤膜或 PVDF 膜）或 TBS（尼龙膜）中，室温下孵育 30min 后，加入 TTBS 或 TBS 至 50ml。
8. 将膜转移至上述含 HRP 或 AP 亲和素-生物素结合物的溶液中，室温下缓慢振荡孵育 30min 后，按步骤 4 法洗膜 30min 以上。
9. 使用合适方法将膜显色（见基本方案 3）。

基本方案 3　生色底物显色

材料（带√项目见附录 1）

转移有蛋白质并标记抗体-酶复合物的膜（见基本方案 2 或备选方案 3）

√TBS

显色液（表 12.5.2）

1. 若膜是用 TTBS 洗涤（见基本方案 2，步骤 7 或备选方案 3，步骤 8），在室温下用 50ml TBS 洗涤 15min。
2. 加入显色液，孵育 10～30min。
3. 用水洗膜终止显色反应或发光反应，置于空气中干燥，成像以长期保存实验结果。

表 12.5.2　显色系统和可见光检测体系[a]

系统	试剂[b]	反应/检测	评价
显色剂			
HRP 标记	4CN	氧化形成紫色沉淀	灵敏度低(Tween 20 影响反应)；曝光后迅速失效
	DAB/$NiCl_2^c$	形成棕黑色沉淀	比 4CN 灵敏度高，易致癌膜容易显色
	TMB[d]	形成紫黑色沉淀	比 DAB 法稳定性高，毒性低；由于灵敏度高，可适用于各种类型的膜，可从 Kirkegaard&Perry，TSI，Moss，Vector Labs 购买
AP 标记	BCIP/NBT	经 NBT 氧化后 BCIP 水解生成靛青色沉淀，减少 NBT 沉淀	比其他 AP 沉淀底物灵敏度高，更可靠，磷酸盐阻碍 AP 活性
	氨基苯二酰肼	产生暗蓝灰色染色物	非常方便，灵敏度高

续表

系统	试剂[b]	反应/检测	评价
发光系统			
HRP 标记	*p*-碘酚	蓝光，*p*-碘酚增强蓝色荧光	检测时间可为几秒至 1h
AP 标记	1,2- 二氧环乙烷磷酸衍生物（如 AMPPD、CSPD、Lumigen-PPD、Lumi-Phos 530）[e]	去磷酸化后底物发光	所有类型的膜均适用，为取得最大灵敏度和最少背景，可向生产商咨询

a. 缩略：AMPPD 或 lumigen PPD；AP：碱性磷酸酶；BCIP：5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸；4CN：4-氯-1-奈酚；DAB：二氨基联苯胺；HRP：辣根过氧化物酶；NBT：四唑氮蓝；TMB：四甲基联苯胺。

b. 试剂用法见附录 1，TMP 用法见试剂盒说明书。

c. DAB/$NiCl_2$ 可以不用 Ni^{2+} 强化，但灵敏度会降低。

d. McKimm-Breschkin（1990）指出，若硝酸纤维素滤膜用 10mmol/L 柠檬酸 EDTA（PH5.0）和葡聚糖磷酸酯处理 10min，则 TMB 的灵敏度高于 4CN 和 DAB，≥BCIP/NBT 的灵敏度。

e. Lumi-Phos 530 中包含 dioxetane phosphate、$MgCl_2$、CTAB 及荧光增强剂，pH9.6。

备选方案 3　生色底物显色

附加材料（其他材料见基本方案 3）

显色底物缓冲液：50mmol/L Tris/HCl，pH7.5（附录 1，适用于 HRP 系统），或二氧烷磷酸酯底物缓冲液（附录 1，适用于 AP 系统）

Nitro-Block 溶液（只适用于 AP 系统）：5%（V/V）Nitro-block（Tropix）二氧烷磷酸酯底物缓冲液混合液，使用前新鲜配制

发光显色液（表 12.5.2）

干净的塑料袋

1. 用 50ml 发光底物缓冲液将膜平衡两次，每次 15min。
2. AP 反应使用硝酸纤维素滤膜或 PVDF 膜，将膜在 50ml Nitro-Block 溶液中孵育 5min，然后用 50ml 底物缓冲液孵育 5min。

   采用 Lumi-phos 530 试剂显色不需要此步骤，尼龙膜上的 AP 反应或任何类型膜的 HRP 反应不需要 Nitro-Block 溶液处理。硝酸纤维素滤膜显色不使用 Lumi-Phos 530 试剂。
3. 将膜转移至 50ml 发光显色液中，浸泡 30s（HRP 反应）或 5min（AP 反应）。
4. 取出膜，干燥后将膜的蛋白质转印面朝下置于一张干净的塑料包裹纸上，将包裹纸折叠后，用显色液浸没膜。
5. 在暗室中，将膜蛋白面朝下置于成像仪中，成像几秒至几小时。
6. 若有必要，将膜用 50ml TBS 洗涤两次，每次 15min，接着进行生色显色（见基本方案 3）。

辅助方案 2　膜蛋白解离与再生

材料

免疫印迹膜

0.2mol/L NaOH

1. 用双蒸水洗涤膜 5min。
2. 用 0.2mol/L NaOH 洗涤膜 5min。
3. 用双蒸水洗涤膜 5min。
4. 继续免疫印迹操作（见基本方案 2 和备选方案 3）。
5. 为了有效地再标记膜，必须使用酪蛋白（AP 标记）或脱脂奶粉作为封闭液。

参考文献：Bjerrum and Schafer-Nielson，1986；Bronstein *et al.*，1992；Mandrell and Zollinger，1984；Tesfaigzi *et al.*，1994

撰 稿 人：Sean Gallagher，Scott E. Winston，Steven A. fuller，and John G. R. Hurrell

［陈国友（第十二章）］

第十三章　肽

在过去的几十年里，将人工合成肽用于免疫学研究的方法发展迅速。因此，对免疫学家们来说，充分了解肽的使用、合成、纯化及鉴定方法是非常重要的。本章集中介绍多肽的两个具体应用：抗肽的抗血清制备以及从多肽库中筛选 B 细胞和 T 细胞抗原表位。

单元 13.1 介绍了如何选择一条合成肽用以制备识别完整蛋白的抗血清：包括如何选择合适的多肽用来免疫，如何将多肽结合至载体蛋白及设计合成多价抗原肽（MAP）。该实验方法在增强免疫应答方面非常有效。

单元 13.2 阐述了针对抗原肽的抗血清的制备方法，同时介绍了免疫接种流程、ELISA 法测定抗体滴度及亲和层析法纯化能够与抗体特异结合的多肽的方法。

无论使用哪种化学方法合成多肽，合成的粗制多肽制剂都含有不需要的副产物。虽然并不需要每一种合成的多肽都是纯化的，但对于生物活性的研究，了解复合物的结构对多肽生物活性的影响是非常重要的。由工厂或公司提供的多肽的纯度从低于 50%到高于 90%不等，总的来说，用高纯度的多肽制备抗血清的产物并不一定是必需的，因为由副产物产生的抗体并不影响目的抗体的活性。但如果对抗原进行定性分析或者用作细胞外检测，高纯度的多肽是最理想的。

通过单克隆抗体（MAb）来鉴定肽或者蛋白质的抗原决定簇的一个有效方法是采用 t-Boc 或 Fmoc 方法的合成组合文库（SCL）。SCL 是由几千万种肽组成的文库，它能简便的通过竞争性或非竞争性的 ELISA 来鉴定能被 MAb 识别的线性抗原决定簇。单元 13.3 介绍了使用位置扫描-合成组合文库（PS-SCL）的方法，该方法非常适合于鉴别能被 MAb 识别的抗原决定簇，这些 MAb 与这些肽和抗原的线性序列对应。

撰 稿 人：John E. Coligan

单元 13.1　合成肽用以制备识别完整蛋白质的抗体

基本方案 1　通过计算机辅助方法选择合适的抗原肽序列

以下的实验设计利用了 Kyte 和 Doolittle（1982）创立的疏水指数学说及 Chou 和 Fasman（1974）创立的 β 转角二级结构的预测方法，这些方法使蛋白质较容易产生线性的可溶的表面结构。

材料

合适格式的蛋白质序列

安装有选定算法软件的计算机，软件包括 GCG（Genetics Computer Group）或者

ProtScale（ExPASy；http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl）

1. 利用选定算法计算蛋白质序列的疏水指数和β转角的趋向。使用 window size 为 7 或 9，并使每个氨基酸权重相等，将结果用图形或数字的形式保存起来。

   window size 决定氨基酸的数目，而氨基酸的数目被用来计算它在窗口中心的值。中心氨基酸的计算值是在窗口里的每个氨基酸值的平均值。

2. 比较得到的两个分析结果，在序列中寻找转角趋势和亲水性均较高的（疏水性低）区域。
3. 检查具有糖基化位点的序列，比如 Asn-X-Ser 或 Asn-X-Thr 等与糖基连接的氨基酸序列。还可以使用 NetOGlyc（ExPASy）来预测哺乳动物蛋白质的黏蛋白 GalNAc O 型的糖基化位点（仔细研究文件；这种方法并不总是成功的）。排除任何含有糖基化位点的序列，除非已知这种蛋白质没有被糖基化，因为糖基可能妨碍氨基酸与抗体的结合。
4. 挑选合适的序列作为抗原肽，这个序列的转角倾向具有最大的阳性值（阳性偏离峰）且在相应位置的疏水性具有最大的阴性值（阴性偏离峰）。此外，肽的亲水区域与氨基或者羧基末端相连，因为它们往往暴露于表面利于溶解。选出一段带电荷的氨基酸残基的序列，如包含 Arg、Lys、His、Glu 和 Asp 残基的序列，因为它们可被定位于蛋白质的表面并且能够提高合成肽的溶解性。

备选方案 1　通过人工筛查挑选合适的肽序列

虽然计算分析方法随时可以利用，但肽序列的挑选也可以通过人工的方法来完成。

1. 观察蛋白质的序列，并且从 10～15 个氨基酸残基的片段中挑出至少包含 2～3 个带电荷残基（Lys、Arg、His、Asp、Glu）的区域。如果不能找到符合这个标准的区域，就选择含有带电氨基酸残基数目最多的序列。
2. 从序列中选出 Ser、Thr、Asn、Gln、Pro 和 Tyr 含量最高的子序列。
3. 利用表 13.1.1 提供的数值和此九个氨基酸残基的窗口（见基本方案 1，步骤 1），计算选中序列中的每一个氨基酸的平均亲水值和转角倾向值。确定计算选定序列尾部残基的值包括侧链残基在内。换句话说，不要使用不同的 window size。

表 13.1.1　氨基酸的疏水指数和β转角指数

氨基酸	标志	疏水指数[a]	β转角倾向指数[b]
精氨酸	Arg(R)	−4.5	0.95
赖氨酸	Lys(K)	−3.9	1.01
天冬氨酸	Asp(D)	−3.5	1.46
谷氨酸	Glu(E)	−3.5	0.74
天冬酰胺	Asn(N)	−3.5	1.56
谷氨酰胺	Gln(Q)	−3.5	0.98
组氨酸	His(H)	−3.2	0.95
脯氨酸	Pro(P)	−1.6	1.52
酪氨酸	Tyr(Y)	−1.3	1.14

续表

氨基酸	标志	疏水指数[a]	β转角倾向指数[b]
色氨酸	Trp(W)	−0.9	0.96
丝氨酸	Ser(S)	−0.8	1.43
苏氨酸	Thr(T)	−0.7	0.96
甘氨酸	Gly(G)	−0.4	1.56
丙氨酸	Ala(A)	1.8	0.66
甲硫氨酸	Met(M)	1.9	0.6
半胱氨酸	Cys(C)	2.5	1.19
苯丙氨酸	Phe(F)	2.8	0.6
亮氨酸	Lue(L)	3.8	0.59
缬氨酸	Val(V)	4.2	0.5
异亮氨酸	Ile(I)	4.5	0.47

a. Kyte and Doolittle (1982)。

b. Chou and Fasman (1974)。

4. 给选定序列中每个氨基酸的值绘图，找出亲水性和相应的转角倾向值最优的序列，这些序列都是合适肽序列的备选。
5. 排除备选序列中含有糖基化基序的序列，如 Asn-X-Ser 和 Asn-X-Thr，这些基序能连接上糖链。一般没有哪段序列能通过羧基端与糖基相连。
6. 挑选其中最好的序列（见基本方案 1，步骤 4）。

基本方案 2　设计一条肽链与载体蛋白相偶联

在偶联之前，与蛋白质相连的肽链中的末端残基通过乙酰化或酰胺化修饰，以维持它们自然的状态。修饰能降低肽的极性并对肽链的溶解性有重要影响。如果这个肽链缺乏充分质子化的侧链，修饰步骤也可以省略。预测可溶性的一般原则是在给定的 pH 下，肽链总的电荷数至少是肽链中的残基的 20%。

1. 选择一条 10～15 个氨基酸的序列（见基本方案 1 或备选方案 1），通过肽链合成仪器合成这条肽。

2a. 如果这条序列内不含有半胱氨酸残基：在它的氨基端或者羧基端加一个半胱氨酸，通过它再利用 MBS（见基本方案 3）使肽链与载体蛋白相连。如果这条序列包含载体蛋白中位置很近的氨基或羧基末端序列，直接将半胱氨酸加在末端则形成序列内部的肽键。

2b. 如果这条序列的末端包含一个半胱氨酸残基：不用加半胱氨酸残基，而是选择利用戊二醛的一种可代替的偶联方法（见备选方案 3）或合成一条多价的抗原肽（MAP；见备选方案 2）。

3a. 如果这条序列的末端残基在与载体蛋白相连的肽段上：通过乙酰化或酰胺化修饰氨基或者羧基末端，以利于与 MBS 相偶联（Geoghedan，1996），并在合成时各自单独合成。与戊二醛偶联时，只要酰胺化羧基末端。

3b. 如果这条序列的末端残基：

a. 若这条序列是载体蛋白氨基或羧基端的序列，且将与 MBS 相偶联，则将没有与其他肽连接的肽段（肽段中不包括额外的半胱氨酸残基）作为游离的氨基或羧基，除非已知它们被正常的封闭了。

b. 若这条序列是载体蛋白氨基或羧基端的序列，且将与戊二醛偶联，那么酰胺化其羧基末端（Geoghegan，1996）。

c. 若这条序列是载体蛋白氨基或羧基端的序列，且将与戊二醛偶联，保持两末端呈游离态。

备选方案 2　设计合成一条多价抗原肽

多价抗原肽（MAP）是由在多分支核上合成的一条简单肽链组成的共价结构，4 个分支或 8 个分支上肽链的序列都是同一个序列的拷贝（图 13.1.1）。这个多分支核可以直接合成或者购买一个合成固相肽的树脂（Advanced ChemTech，Novabiochem，Applied Biosystems，AnaSpec 和 Bachem Bioscience）。

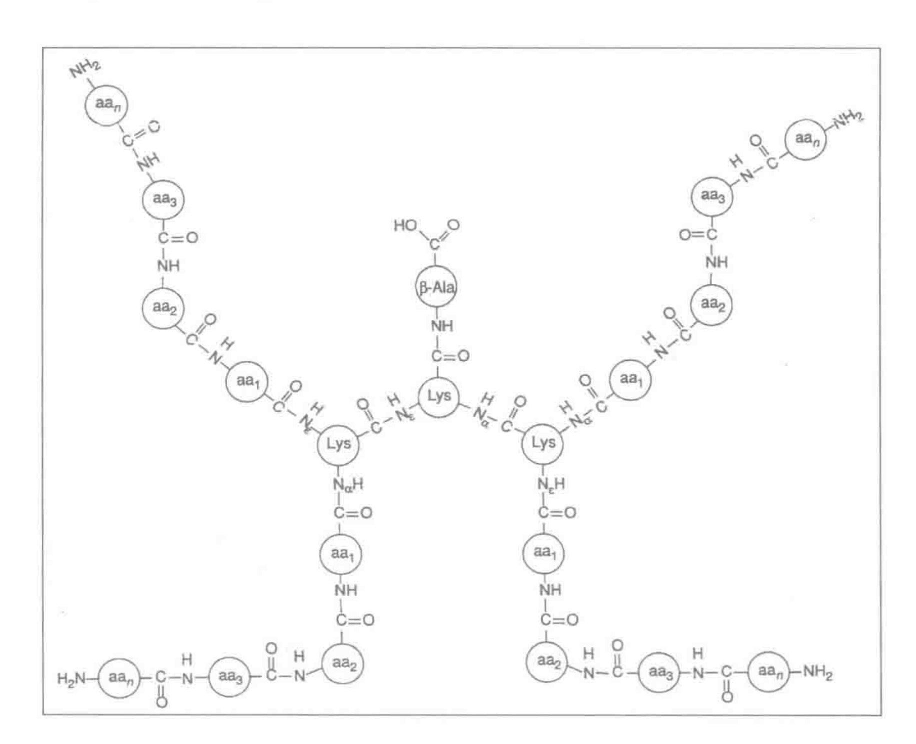


图 13.1.1　四分支 MAP。MAP 中心由 β-丙氨酸残基连接到带有赖氨酸支架的固相表面所组成。第一个赖氨酸残基通过其 α-酰基化羧基连接到 β-丙氨酸，为链的延伸提供两个初始的氨基酸功能团（α 和 ε）。赖氨酸支架由两个赖氨酸残基组成，反过来能为链的延伸提供 4 个功能团。MAP 八分支结构是由两层四分支所组成。

1. 选择一条 10 个或 15 个氨基酸残基的序列（见基本方案 1 或备选方案 1）。如果存在半胱氨酸残基，采取一些措施使它们的数目减少。

2. 使用四或八分支中心合成 MAP，但只有在肽链仅含 12～14 个残基或高度亲水时，才使用八分支。

　　八分支的 MAP 不易刻画其特征，并且可能引起不同的抗体群对抗某些人工合成产物。

3. 可选：若选定的序列不是载体蛋白的氨基末端，则乙酰化序列的氨基末端（Geoghegan，1996）。
4. 将 MAP 不与载体偶联而直接作为一个免疫原（如单元 13.2）。

基本方案 3　使用双功能团试剂将合成肽偶联至载体蛋白

钥孔虫戚血兰素（KLH）作为载体，共同的问题是其低溶解性，但 Pierce Chemical 公司出售的 KLH 制剂据说有较好的溶解性。牛或兔血清白蛋白（BSA 或 RSA）也能够作为载体，但它诱导的免疫反应较弱且与哺乳动物的蛋白质进化相似。

KLH 能够被 MBS 活化（见下），或直接购买 MBS 活化的 KLH（Piece，Boehringer Mannheim）。硫代-*m*-苯甲酰马来酰亚胺-*N*-羟基琥珀酰亚胺酯（硫代-MBS，MBS 的水溶性的替代物），氯化琥珀胆碱-4-(*N*-马来酰亚胺-甲基)-环己烷-1-羧酸盐酯（SMCC）和它的硫酸化的类似物，含有一个对 pH 稳定的马来酰亚胺的硫代-SMCC，可作为 MBS 的替代物。这些硫代的试剂能够溶解于水溶液，而其他种类只能溶解在有机溶剂；列出的浓度适合于全部四种试剂。

确保肽链的末端半胱氨酸的硫基基团的数目保持减少的状态。在正常的合成条件下，如果肽链合成好后是低压冻干的且立刻干燥保存，通常硫基保持在减少的状态。在这步骤中不要将 Tris 或其他的缓冲液用于初始的氨基功能团。

注意：MBS 是一种水敏感的刺激剂，使用前阅读说明书。

材料（带√项目见附录 1）

钥孔虫戚血兰素（KLH；Pierce，Sigma，Calbionchem 或 Boehringer Mannheim）

√0.01mol/L 磷酸钠盐缓冲液，pH7.5

MBS/DMF 溶液：10mg/ml MBS（Pierce）溶于新鲜的 *N*，*N*-二甲基甲酰胺（DMF）

√0.05mol/L 和 0.01mol/L 磷酸钠盐缓冲液，pH7.0

合成 N 端或者 C 端半胱氨酸数目减少的肽链（见基本方案 2）

√6mol/L 盐酸胍盐（可选）

平底玻璃管

约 0.9cm×15cm 的凝胶过滤柱，G25 或 G50 的葡萄糖凝胶（Amersham Bioscience）或者 P2 或 P4 树脂的生物凝胶（Bio-Rad）；或者预先填充好的 PD-10 柱（Amersham Bioscience）

1. 将 5mg KLH 溶解在约 0.5ml 的 0.01mol/L 磷酸钠盐缓冲液中，pH7.5，放置于平底玻璃管中。
2. 添加 100μl MBS/DMF 溶液，室温条件下在微型摇床上轻摇 30min。允许有少量的沉淀物，但如果沉淀物较大，则重复一次。

3. 使用约 0.9cm×15cm 的凝胶过滤柱从游离的 MBS 中分离出被 MBS 活化的 KLH，再用 pH7.0、0.05mol/L 的磷酸钠盐缓冲液平衡洗脱凝胶（Hagel，1998）。收集 0.5ml 的洗脱液并测出它们 280nm 的光吸收值。
4. 保留第一峰值的洗脱液（KLH-MBS 交联物），弃去第二个峰值的洗脱液（未与 MBS 偶联）。收集上述 KLH-MBS 偶联的成分。
5. 将 5mg 的合成肽溶解在 pH7.0、0.01mol/L 的磷酸缓冲液中，最好立刻使用。若肽的溶解性较低，加入 6mol/L 的盐酸胍盐。
6. 将肽的溶解液加入 KLH-MBS 偶联剂的溶液中。在室温条件下用微型摇床轻摇 3h 或过夜。
7. 4℃条件下在 4L 蒸馏水中透析过夜（附录 3H）。在 24h 内免疫（单元 13.2）。

备选方案 3　使用双功能团试剂将合成肽偶联至载体蛋白

若肽链中包含 Cys、Tyr、Lys 或 His 残基，不得使用这种方案，不得使用 Tris 或其他含伯氨类缓冲液。

附加材料（其他材料见基本方案 3，带√项目见附录 1）

50mmol/L 硼酸钠盐缓冲液，pH8.0（用 HCl 校正 pH）
√新鲜配置的 0.15%的戊二醛溶液
1mol/L 甘氨酸溶解至 pH8.0、50mmol/L 的硼酸钠盐缓冲液

1. 将 5mg 的 KLH 溶解在 1.0ml 的 pH8.0、50mmol/L 的硼酸钠盐缓冲液中，加入 5mg 的合成肽。
2. 缓慢加入 1ml 刚配置的戊二醛溶液，在室温条件下温和混匀。继续在此条件下反应 2h（出现黄色或者乳白色）。
3. 添加 0.25ml 的 1mol/L 甘氨酸结合未反应的戊二醛（可能形成深黄色或棕色）。
4. 4℃下在 4L 的 pH8.0、50mmol/L 硼酸钠盐缓冲液透析反应混合物过夜，并继续在蒸馏水中透析过夜（附录 3H）。立刻用作免疫原（单元 13.2）。

辅助方案　计算肽连接到载体蛋白上的摩尔率

1. 确定载体蛋白、肽链和肽-载体蛋白连接体的氨基酸组成（通常从肽合成时的资料中获取）。确保偶联体中不含有未偶联的多肽（即偶联体应被充分的透析）。
2. 确定一个合适的换算系数，计算未结合的载体蛋白的分子质量与肽-载体连接体蛋白的摩尔量的关系。比较所有出现在载体蛋白或偶联体中的三个或更多的氨基酸的摩尔量的比率，而不是出现在肽链中的氨基酸，来确定这个换算系数。

例如，用表 13.1.2 中的 TGLRDSC 肽链，选择 A、K 和 I：

$$\begin{aligned}\text{SF} =& [(\text{偶联体中 A 的 pmol/ 载体蛋白中 A 的 pmol}) + \\ &(\text{偶联体中 K 的 pmol/ 载体蛋白中 K 的 pmol}) + \\ &(\text{偶联体中 I 的 pmol/ 载体蛋白中 I 的 pmol})]/3 \\ =&(206/103 + 125/65 + 135/65)/3 = 2.0\end{aligned}$$

这个换算系数意味着载体蛋白与肽-载体偶联体连接后的水解产物是与载体蛋白交联

后的水解产物的 2 倍。

表 13.1.2　TGLRDSC 肽偶联至载体蛋白的计算数值范围[a]

氨基酸	载体蛋白的组分	肽/载体偶联体的成分	载体蛋白中偶联氨基酸的数目	肽中偶联氨基酸的数目
D	80	185	160	25
E	110	222	220	—
G	95	215	190	25
S	65	150	130	20
T	70	163	140	23
H	10	19	20	—
P	25	51	50	—
A	103	206	206	—
M	5	11	10	—
V	60	118	120	—
F	22	45	44	—
L	55	133	110	23
I	65	135	130	—
C	7	22	14	8
Y	13	25	26	—
K	65	125	130	—
R	75	177	150	27
总计/pmol	925	2002	1850	151

a. 计算肽链偶连的数值，分子质量采用 100kDa。所有数值单位均为皮摩尔。

3. 计算偶联体肽链的摩尔数，通过从偶联体中出现的氨基酸的摩尔数减去载体中出现的相同氨基酸的摩尔数。选择 3 个或 3 个以上的氨基酸，并包括 SF，如下所示：

　　选择 G、L 和 R 氨基酸：

　　偶联体肽链的 pmol = {[偶联体中 A 的 pmol − (SF × 载体中 A 的 pmol)] + [偶联体中 K 的 pmol − (SF × 载体中 K 的 pmol)] + [偶联体中 I 的 pmol − (SF × 载体中 I 的 pmol)]}/3

$$=\{[215-(2\times 95)]+[133-(2\times 55)]+[177-(2\times 75)]\}/3$$

$$=25\text{pmol}$$

4. 计算在偶联体水解产物中载体蛋白的摩尔数，如下所示：

　　在偶联体中的载体蛋白 pmol = 所有载体蛋白氨基酸总的 pmol/载体蛋白的分子质量 × 110

其中所有载体蛋白氨基酸总的 pmol = SF ×（所有组成载体的氨基酸的摩尔数），110 是氨基酸的平均分子质量。

　　在这个例子中，载体蛋白中的氨基酸有 1850pmol 在偶联体中；因此，有 1850pmol × (110/100 000) = 2.04pmol 的载体蛋白在连接体中。

5. 通过步骤 3 和 4 确定肽链与在偶联体中载体蛋白的关系。

上例得出 25pmol 肽/2.04pmol 载体蛋白的比率=12.2 分子肽链/1 分子的载体蛋白。

参考文献：Tam，1988；Van Regenmortel *et al.*，1988

撰 稿 人：Gregory A. Grant

单元 13.2 抗多肽血清的制备

基本方案 1 在兔体内制备抗多肽血清的免疫接种流程

免疫时可能不止采用一种肽链免疫动物，而且使用多蛋白的肽序列会增加成功的概率。当所需的抗血清的量为 10～200ml 时，通常选用家兔免疫接种。这种方法需要有较强的处理家兔的经验（温和对待，约束力，免疫接种，取血样）。

材料（带√项目见附录 1）

家兔

肽-载体的连接体（单元 13.1）

√PBS，pH7.5

弗氏完全佐剂（FCA；Pierce Biotechnology）

弗氏不完全佐剂

1. 收集血样（如从耳动脉或耳静脉），每只家兔准备 2～5ml 免疫前的血清（单元 1.2）。至少准备 2 只家兔，以防一只家兔死亡或者免疫接种失败。
2. 将 0.7～1.0mg 的肽-载体的连接体溶于 1ml 的 PBS，并加入 1ml FCA 彻底混溶。每只家兔免疫接种 1ml 这种稳定的乳浊液，在皮下多个位点接种，每个位点 0.1～0.2ml（单元 1.2）。
3. 2～6 周后（或检测到免疫反应减弱时较理想；见基本方案 2），准备一份新的乳浊制剂追加剂量，使用相同的连接体但添加的是弗氏不完全佐剂。如上所述在皮下多个位点接种。若免疫原的量有限，则使用初次免疫接种量的 1/4。
4. 在加强免疫后 3 周取家兔血样，在 4 周后再次取血获取抗肽的血清。检测免疫反应（见基本方案 2）。
5. 可选：若 5～6 周后免疫反应依然较低，在 10～12 周再次加强免疫一次。并在最后一次接种后 3～4 周后再次取血。不要第三次加强免疫。
6. 在免疫反应最强的时候在动物身体许可的范围内取尽可能多的血样。对有免疫反应的兔子在合适的时间取血，这取决于对抗血清质量的要求或已获得了足够多的抗血清。将血清储存在−70℃。
7. 可选：通过免疫亲和层析法，将抗血清中不需要的成分（如抗载体的抗体）去掉以纯化抗肽的抗体。

基本方案 2 用间接 ELISA 法检测抗多肽抗体滴度

这种检测方法能从长度大于 15 个氨基酸的肽中筛选出抗血清。对于较短的肽链，

可用生物素标记肽链（单元 9.3）或者用不同于获得抗血清时使用的肽-载体偶联体包被反应板（单元 13.1）。

材料（带√项目见附录 1）

0.2～2.5μmol/L 合成肽（长度≥15）溶于 0.1mol/L 的碳酸钠盐溶液（附录 1）使得肽-载体连接体中肽的浓度为约 1μmol/L。

√封闭液

√PBST

抗多肽血清（见基本方案 1）

阳性对照（如血清或已知抗体）

偶联体探针：羊抗兔的免疫球蛋白偶联到碱性磷酸酶（Kirkegaard & Perry Laboratories）

√碱性磷酸酶底物溶液

96 孔培养板，干净的聚苯乙烯的微量滴定培养板较优

滤光片/单色光镜吸收值为 405～415nm 的酶联仪

1. 用 100μl 溶解在 0.1mol/L 的碳酸钠盐溶液的 0.2～0.5μmol/L 合成肽混合液，包被 96 孔培养板，并确保每个孔的底部覆盖均衡。在 4℃下孵育过夜或在室温条件下放置 2～6h。如果肽抗原不能吸附上去，将它们溶于其他的 pH4～8 的缓冲液，或使用经处理的能特异结合蛋白质的微孔培养板。
2. 吸弃孔内的肽溶液，将培养板在水槽上轻拍。
3. 每孔加入 200μl 封闭液，封闭培养板小孔中依然有活性的位点，并在室温条件下孵育≥30min。每孔加入约 300μl 的 PBST 洗涤 3 次，并将培养板放在水槽上方轻轻拍击。
4. 准备至少 8 份以上 300μl 封闭液连续稀释抗肽的抗血清溶液，范围从 1∶100～1∶12 000或更高。同样将阳性对照（血清或已知抗体）和阴性对照（无血清）连续稀释在封闭液中。添加 100μl 样品或者对照到培养板各孔内并孵育≥1h。再用 PBST 洗涤各孔 3 次。为了防止交叉污染，不可将孔中添加过满。
5. 按生产商的推荐浓度将偶联体探针溶于封闭液（1∶1000 到 1∶5000）。每孔内加入 100μl 偶联体，室温条件下放置 1h。用 PBST 将培养板洗 3 或 4 遍。
6. 加入 100μl 碱性磷酸酶底物溶液，室温条件下孵育≥20min，直到可以观察到溶液有黄色出现。
7. 用酶联仪在 405nm 波长下检测其光吸收值，并找出光吸收值显著增强的抗肽的抗体。注意：用 ELISA 检测，样品中抗体的结合数量和平均亲和性要更优。

基本方案 3　使用酸性、碱性或离液洗脱液的亲和层析柱

除掉血清中产生的抗载体蛋白的抗体以达到纯化产物的目的。采用肽链亲和层析纯化出的抗体或许能够与肽抗原结合。然而，为了确保抗体可以结合完整的蛋白质抗原，亲和层析纯化时要使用完整的蛋白质序列。使用酸性洗脱液是常用的洗脱抗体的方法，若不能成功洗脱，则尝试碱洗脱液或离液洗脱液。也有研究者将三种方法混合使用以增

强被遮盖抗体的特异性。

材料（带√项目见附录1）

√磷酸钾盐/NaCl溶液（添加叠氮钠保存柱子）
含有抗肽抗体的已知抗血清
平衡缓冲液：1mol/L Tris·Cl，pH7.5（附录1）
√洗脱液
√PBST
亲和柱（见辅助方案1和2）
0.45μm的针孔式滤器和3ml或5ml的注射器，并结合牢固
13mm×100mm的检测杯

1. 检查亲和层析柱，若有明显的细菌生长，则丢弃不用；若里面有少量的气泡未被填充，则重新填充。
2. 预先平衡层析柱，用磷酸钾盐/NaCl溶液洗涤直到检测设备（如分开或联机的MV检测仪）显示光吸收值在254～280nm基线范围内（<0.1AU）。依靠自身的重力或泵的压力运行。对于直径1cm的柱子，最好使整个过程的流速<1ml/min。
3. 准备1～2ml抗血清样品，加入到已经过磷酸钾盐/NaCl溶液平衡的柱子内。
4. 使用结合牢固的0.45μm的针孔式滤器和3ml或5ml的注射器过滤稀释过的血清，或室温，1000*g*离心10min。
5. 将样品加入亲和层析柱中，收集流出的未结合的抗血清。如果需要，再次色谱分析流出的血清，其中也许含有重要的抗体。
6. 用≥20ml的磷酸钾盐/NaCl溶液清洗柱子，检测洗脱液直到UV光吸收值回到基线附近。
7. 准备10个13mm×100mm的检测杯，如果使用的是酸性或碱性洗脱液，在杯中加入0.2ml的平衡缓冲液；如果用的是离液洗脱液，加水即可。
8. 用5ml合适的洗脱液洗脱柱子，收集1ml放入已加平衡缓冲液的检测杯中（酸性或碱性洗脱液）或加水的杯中（离液洗脱液）。若是酸性洗脱液，还应振荡检测杯混合溶液并防止抗体较长时间暴露在低pH下。
9. 在背景水平上（如包含抗体），检测已中和部分的洗脱液的UV光吸收值。典型抗体在1mg/ml溶液中A_{280}的吸收值为1.4。
10. 收集几份包含抗体的缓冲液（通常为3～5份），在4℃下至少更换两次100倍体积的PBST进行透析。产物储存在−70℃，根据需要也可分为几部分储存。
11. 洗脱抗体后，尽快用20ml磷酸钾盐/NaCl溶液清洗柱子。若要储存柱子至下次使用前，则加入叠氮钠并保存在4℃。

辅助方案1　预先溶胀的NHS或CNBr活化树脂的肽免疫亲和层析柱的制备

CNBr活化的树脂，与*N*-羟基琥珀酰亚胺酯（NHS）活化的树脂不同，在树脂基质与结合位点之间没有间隔段。这就增加了空间的改变，影响了与抗体的结合。但是，这种树脂能有效地用于长的肽链和蛋白质抗原。

色谱仪的生产商已提供了详细的使用说明。本方案只简单介绍这些方法，具体方法详见生产商的说明书。

材料（带√项目见附录 1）

带有一个游离氨基团的肽（最好不含 Lys）
N，*N*-二甲基酰胺（DMF）
活化的树脂（选一个）：
溴化氰（CNBr）活化的 Sepharose 4 FF（Amersham Biosciences）
N-羟基琥珀酰亚胺酯（NHS）活化的树脂：Affi-Gel 10（Bio-Rad；适用中性的和碱性肽），Affi-Gel 15（Bio-Rad；适合酸性肽），或 NHS 活化的 Sepharose 4 FF（Amersham Biosciences；适合酸性肽）
1mol/L 的乙醇胺 · HCl，pH8 或 1mol/L Tris · Cl，pH7.5（各自配方见附录 1）
√磷酸钾盐/NaCl 溶液（添加叠氮钠保存柱子）
√PBS，pH7.5
15ml 带盖的非聚苯乙烯离心管
30ml 玻璃陶瓷漏斗或 30ml 的布氏漏斗
1cm×10cm 的玻璃或塑料层析柱

1. 将 10mg 带一个游离氨基团的肽溶于 4ml DMF。如果有必要，过滤或短时离心使之澄清（如室温，1000*g* 离心 10min）。

   若肽不溶于 DMF，可以尝试 DMSO、甲醇、乙腈、二噁烷、丙酮、50mmol/L 磷酸钠盐（pH7.5）/0.4mol/L NaCl 或者这些溶剂的混合液。若使用的是水溶液，保持 pH 接近中性。在偶联过程中避免使用含有自由氨基的溶剂或缓冲液，比如 Tris 或铵盐。

2a. 若是 CNBr 活化的树脂：称取 1g 干燥的 CNBr 活化的 Sepharose 4FF 树脂，并放入 15ml 非聚苯乙烯离心管中，加入 10 ml 去离子水并在室温条件下温和混匀 1h 或在 4℃下过夜。一旦再水合，则不要让树脂脱水。

2b. 若是 NHS 活化的树脂：在打开瓶子前摇晃，使树脂能均衡地悬浮。

3. 将 6～8ml 的黏结剂转移到 30ml 的玻璃漏斗或布氏漏斗。真空泵温和地抽提溶剂，但要防止树脂干燥过度。

4. 尽快用 10～20ml 去离子水清洗树脂三次，每次都充分搅拌以分解团块并促进再次水合。避免树脂完全干燥。

5. 用一个刮勺将树脂形成的团块转移到 15ml 的非聚苯乙烯的离心管中。加入肽溶液（步骤 1）并盖上盖子。使用搅拌器在室温条件下温和的搅拌 1h 或在 4℃下搅拌 4h 。添加 0.5ml 的 1mol/L 乙醇胺 · HCl，pH8（或 1mol/L Tris · Cl，pH7.5）并温和搅拌 1h。

6. 将黏结剂倒入一个干净的玻璃漏斗，抽提反应混合液并用 10～20ml 的去离子水洗三遍。用等量的磷酸钾盐/NaCl 溶液再悬浮树脂。

7. 将已偶联的树脂倒入一个 1cm×10cm 的玻璃或塑料层析柱，让柱床在重力的作用下沉积。用≥50ml 的磷酸钾盐/NaCl 溶液清洗柱子。如果柱子不再使用，加入叠氮钠

并保存在 4℃。

8. 在使用真正的抗血清进行纯化前，用 PBS 作为样品和相同的洗脱缓冲液做一次模拟纯化，为抗体的纯化做准备。

本方案为柱床体积为 3～4ml 的柱子提供了足够的树脂，这种体积对每次纯化 1～2ml 的抗血清较适合。若柱子能较好的再次均衡并保存良好，可使用多次。

辅助方案 2 巯基化树脂填充的肽亲和层析柱的制备

在使用这个方案前必须减少肽溶液的体积。为了防止肽被再次氧化，避免通气并在含有 EDTA 的缓冲液中快速进行肽的偶联反应。

材料（带√项目见附录 1）

二硫键较少的肽（单元 13.1）
√PEB
尿素或盐酸胍，可选
二甲基亚砜（DMSO），可选
Sulfolink（Pierce）或丙硫基 Sepharose 4B（Amersham Biosciences）
半胱氨酸（L-Cys 或 D/L-Cys 的结晶或粉末）
√磷酸钾盐/NaCl 溶液（若要保存柱子须加叠氮化钠）
√PBS，pH7.5
30ml 玻璃陶瓷漏斗或 30ml 的布氏漏斗
15ml 的带盖离心管
1cm×10cm 的玻璃或塑料层析柱

1. 将 5mg 二硫键较少的肽溶于 5ml 的 PBE 中。若肽不溶于这种缓冲液，添加 4mol/L 的尿素或盐酸胍。或将肽溶于少量的 DMSO 再加至 PBE，最后 DMSO 的浓度要≤20%。
2. 打开前，摇动含有 Sulfolink 或丙硫基 Sepharose 4B 的瓶子，使树脂能够均衡的悬浮。取 6～8ml 到 30ml 的玻璃陶瓷漏斗或布氏漏斗。真空泵温和地抽提溶剂但要避免树脂过分干燥。
3. 用 10～20ml 的 PBE 洗树脂三遍，每次洗时都要充分搅拌，使树脂的团块分解以促进再次水合。防止树脂过分干燥。
4. 用一个刮勺将树脂形成的团块转移到 15ml 的离心管中。加入肽溶液（步骤 1）并盖上盖子。使用搅拌器在室温条件下温和地搅拌 30min 。将离心管放置在架子上并于室温条件下搁置 1h。
5. 加入 30mg 的半胱氨酸，在室温条件下温和地振荡 30min。再将离心管放置在架子上并于室温条件下搁置 1h。
6. 将黏结剂倒入一个干净的玻璃漏斗。抽提反应混合液并用 10～20ml 的去离子水洗三遍。用等量的磷酸钾盐/NaCl 溶液再悬浮树脂。
7. 将已偶联的树脂倒入一个 1cm×10cm 的玻璃或塑料层析柱，让柱床在重力的作用下沉积。用≥50ml 的磷酸钾盐/NaCl 溶液清洗柱子。如果柱子不再使用，加入叠氮钠

并保存在 4℃。

8. 在纯化真正的抗血清前，用 PBS 作为样品和相同的洗脱缓冲液做一次模拟纯化，为抗体的纯化做准备。

参考文献：Harlow and Lane，1998；Van Regenmortel，1994

撰 稿 人：John Mark Carter

单元 13.3　采用合成肽组合库鉴定 B 细胞和 T 细胞的表位

基本方案 1　采用 PS-SCL 筛选抗体抑制剂

本方案采用一种六肽的位点扫描-合成肽组合库（PS-SCL；表 13.3.1）来鉴别特异性肽，它能阻断一种单抗与它相应的抗原的结合。由作者开发的 PS-SCL 见本单元末尾表 13.3.2。

表 13.3.1　用于六肽的位点扫描-合成肽组合库（PS-SCL）[a] 的肽序列

多肽数目	肽序列
1～20	Ac-O_1XXXXX-NH_2
21～40	Ac-XO_2XXXX-NH_2
41～60	Ac-XXO_3XXX-NH_2
61～80	Ac-XXXO_4XX-NH_2
81～100	Ac-XXXXO_5X-NH_2
101～120	Ac-XXXXXO_6-NH_2

a. 六肽 PS-SCL 的 120 肽混合物由一个分别在 6 个位置出现的特异的氨基酸（O_1、O_2、O_3、O_4、O_5 或 O_6）和 5 个随机氨基酸（X）所组成，确定的氨基酸混合物已知各组分基本上等摩尔分布。Ac，乙酰化。

表 13.3.2　合成组合库的位点扫描

组成	库	N 端	C 端	样本编号
L-氨基酸	六肽	Ac-	$CONH_2$	120
		H-	$CONH_2$	120
	六肽（双位点）	Ac-	$CONH_2$	1200
		H-	$CONH_2$	1200
	九肽	Ac-	$CONH_2$	180
		H-	$CONH_2$	180
		Ac-	$CONH_2$	180
		H-	$CONH_2$	180
	十肽	Ac-	$CONH_2$	200

续表

组成	库	N端	C端	样本编号
L-氨基酸		H-	$CONH_2$	200
		Ac-	$CONH_2$	200
		H-	$CONH_2$	200
	十二肽	Ac-	$CONH_2$	240
		H-	$CONH_2$	240
D-氨基酸	三肽	Ac-	$CONH_2$	60
	六肽	Ac-	$CONH_2$	120
	六肽(双位点)	Ac-	$CONH_2$	400
		H-	$CONH_2$	400
	十肽	Ac-	$CONH_2$	200
		H-	$CONH_2$	200
L-,D-和非天然氨基酸	四肽	H-	$CONH_2$	240
		Ac-	$CONH_2$	240
	环状二硫化物	COO-	$CONH_2$	171
	糖基化四肽	H-	$CONH_2$	160

材料（带√项目见附录1）

肽或蛋白质抗原

目的抗原的单克隆抗体（MAb）

1%（m/V）BSA/PBS（见附录1 PBS）

六肽的PS-SCL（表13.3.1）：5mg/ml的120肽混合物（若需详细资料，联系C. Pinilla，cpinilla@tpims. org）

辣根过氧化物酶（HRP）偶联MAb的同种型抗体的特异性的抗鼠抗体（Calbiochem；按生产商提供的说明书使用）

√显影液

4mol/L硫酸

结合能力较强的聚苯乙烯96孔微量滴定板（如A/2板，Costar；Immunolon 4板，Dynatech）

保湿盒：用湿纸巾密封的Tupperware盒

带有492nm滤光片的96孔微量滴定板读板仪（酶联仪）

1. 通过抗原-抗体结合的直接和竞争性ELISA（见辅助方案）选择最佳的抗原和单抗浓度用于筛选检测。
2. 加入50μl/孔的优化浓度的肽或蛋白质抗原包被96孔板。每种肽复合物做2个复孔。若每板有80个样孔（图13.3.1）则准备三个板检测PS-SCL的120肽复合物。在37℃下的保湿盒中孵育2h或在室温条件下放置过夜（18h）。
3. 翻转滴定板并弃去液体，用水清洗滴定板10次。将滴定板在纸巾上拍击以除去残留

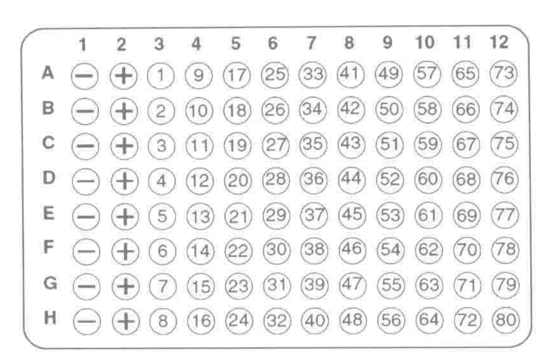


图 13.3.1　竞争性 ELISA 筛查 80 肽混合物设计示意图。包被有抗原的 96 孔微量滴定板加入抗体和肽混合物后孵育检测混合物的抑制活性。肽混合物在第二块板上重复检测；每一行都包括只含有抗体的孔（－；第一列）和含有目的抗原与抗体混合物的孔（＋；第二列）（抗原在每一列中做 2 倍的连续倍比稀释）。

的水。不要让孔内过于干燥。

4. 每孔加入 100μl 1%的 BSA/PBS，在 37℃下的保湿盒中孵育 1h，封闭未特异结合的位点。
5. 按步骤 3 清洗各孔。添加 25μl 肽复合物（1～5mg/ml）或图 13.3.1 所示浓度的抗原对照到相应的孔内。再向每孔内加入 25μl 适宜浓度的 MAb。4℃下的保湿盒中孵育 18h 或在 37℃下孵育 1h。
6. 清洗各孔并加入 50μl/孔的 HRP 偶联的抗鼠的抗体。37℃下保湿盒中孵育 1h。
7. 清洗各孔并加入 50μl/孔的显色液。室温条件下在暗室内放置 10～15min。最后向每孔添加 25μl 硫酸停止反应。
8. 在 A_{492} 波长下用酶联仪检测，若发现肽复合物在 A_{492} 下读数较低，说明活性抑制。可有选择地计算每块板中各个肽复合物与第一列中所对应的对照抗原的抑制率。
9. 通过竞争性 ELISA 再次检测 具＞30%～50%抑制性的肽复合物（步骤 2～8），使用 4 组连续的 2 倍比肽复合物的稀释液。若肽复合物具＞50%的抑制性，则使用 8 份连续的 2 倍比稀释液检测。
10. 参照 50%的抗体结合值（IC_{50}），确定抑制性肽复合物的浓度，并挑选出 IC_{50} 值最低活性最强的肽复合物。
11. 为每 6 个氨基酸位点挑选活性最高的肽复合物。在选出的肽复合物的固定位点上的氨基酸的基础上，合成与这些氨基酸相关的所有可能组合的联合体的单个肽。对已知序列的免疫原，找出其抗体所识别的抗原决定簇。
12. 通过单个肽的竞争性 ELISA 实验验证 PS-SCL 的筛选结果，并鉴定其特异的抗原决定簇或高亲和性配体。

基本方案 2　筛查 PS-SCL 鉴定 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ T 细胞的配体

注：除非有特别的说明，所有孵育过程都应在 37℃，5% CO_2 的培养箱中进行。与活细胞处理相关的所有试剂或仪器必须是无菌的。

材料

T 细胞克隆（TCC）

十肽 PS-SCL（表 13.3.2）：200 肽复合物（若需详细资料，联系 C. Pinilla，cpinilla@tpims.org）

抗原呈递细胞（APC）和合适的培养基

[^{3}H] 胸腺嘧啶

$Na_2{}^{51}CrO_4$（用于铬释放检测）

检测 INF-γ 的 ELISA 试剂盒（PharMingen）

96 孔圆底微量滴定板（Costar）

$CD4^+$ 增殖检测所需的细胞收集器和 β 液闪仪

检测细胞毒实验的 γ 计数器或检测所标记的靶细胞释放出的荧光的高敏感度荧光计

1. 培养 TCC 达到必要的细胞数（5×10^6～100×10^6 个细胞数用于筛选一个十肽库）。
2. 针对每个十肽 PS-SCL 的 200 肽混合物检测 TCC 的增殖（$CD4^+$）或细胞毒（$CD8^+$）反应。所有的反应都设定 2 个复孔（需要 5 个 96 孔板）。
3. 将 0.1ml 的 TCC 细胞混悬液加入 96 孔板，孔内已事先加入适量的 APC 和肽混合物（终浓度 0.1mg/ml；因为细胞毒性问题不推荐高浓度）。将细胞和 PS-SCL 在 37℃共培养 24～72h 或 4h 用于 ^{51}Cr 释放试验。
4. 测定针对 TCC 的肽混合物的活性，选用适合于细胞类型和每种 TCC 的检测方法。
   a. $CD4^+$ T 细胞增殖：见单元 8.8。在细胞孵育的最后 8h 每孔加入 0.25～1μCi ^{3}H TdR。收集细胞并用 β 液闪仪测定掺和的放射性。
   b. $CD8^+$ T 细胞的 ^{51}Cr 释放检测：见单元 2.10。从每孔内取出 150μl 到计数杯或另一培养板，测定释放到上清液中的放射源比例。
   c. $CD8^+$ T 细胞的 IFN-γ 产物：见单元 5.7。将上清液转移到包被抗干扰素单克隆抗体的培养板。特定的 ELISA 试剂盒检测。

   重复实验验证结果。
5. 将最具活性肽混合物中的已确定的氨基酸与 PS-SCL 的每个位点结合，在库筛查所得的结果基础上设计并鉴定肽。
6. 通过生物测定学分析，比较从十肽库中获取的系统的数据与蛋白质库中的肽序列，来检测天然的或潜在的交叉反应的配体。
7. 用从十肽库或蛋白质库中推断出的结果合成每条肽链。测定各个肽的活性。

辅助方案　优化用于筛查的抗原和抗体浓度

材料（带√项目见附录 1）

肽或蛋白质抗原：一样品溶于 PBS 而另一样品溶于碳酸氢盐缓冲液（肽长度<10 个残基的需连接到一个大的蛋白质上）

√PBS

√碳酸氢盐缓冲液，pH9.6

肽或蛋白质抗原特异性的单克隆抗体（MAb）

针对同型 MAb 的特异性的辣根过氧化酶（HRP）偶联的二抗（Calbiohem），按生产商的说明书溶于 1% BSA/PBS

√显色液

4mol/L 硫酸

结合性较强的聚苯乙烯 96 孔微量滴定培养板（如 A/2，Costar；Immunolon 4，Dynatech）

湿盒：铺放湿纸巾的密封的 Tupperware 盒

带有 492nm 滤光片的酶联仪

1. 将 50μl 肽或蛋白质抗原的 PBS 溶解液加至 A/2 96 孔培养板的第一列的一个孔内，整个标准的 96 孔培养板全部加 100μl/孔。当合成肽的长度为 10～20 个残基时使用的浓度为 100～500ng/ml；当长度＞20 个残基时用的浓度为≤25ng/ml。对于蛋白质抗原，使用浓度为 1～10μg/ml。再将抗原溶于碳酸氢盐缓冲液。用稀释缓冲液将培养板内的抗原做 2 倍的倍比稀释，每个浓度做 2 个复孔。设置非特异性结合的对照（单元 1.1）。在 37℃的湿盒中孵育 2h 或在室温下孵育 18h（过夜）。

　　比较 PBS 和碳酸氢盐缓冲液的溶解结果来选择缓冲液以达到更好的效果。

2. 倒掉孔中的液体并用水清洗各孔 10 次。将培养板倒置在纸巾上拍击以除去残留的水分，但不要让小孔过分干燥。
3. 每孔添加 100μl 的 1% BSA/PBS 溶液封闭没有特异结合的位点。在 37℃的湿盒中孵育 1h。
4. 同步骤 2 清洗各孔。每孔添加 50μl MAb（1μg/ml）并用 1% BSA/PBS 在培养板上设置 2 倍的倍比稀释浓度。在 4℃的湿盒中放置过夜。
5. 清洗各孔并加入 50μl/孔的 HRP 偶联的二抗。在 37℃的湿盒中孵育 1h。

　　对 IgG 特异性的 MAb，要使用 HRP 偶联的重链和轻链均具特异性的抗鼠的抗体。对不同型的 MAb，选择合适的二抗。

6. 清洗各孔并加入 50μl/孔的显色液。室温条件下暗处放置 10～15min。每孔加入 25μl 4mol/L 的硫酸终止反应，并用酶联仪检测 A_{492} 处光吸收值。
7. 根据给出的最佳结果确定抗原和抗体的浓度（如最低的抗原和抗体浓度得出的 A_{492} = 1.5～2.0）。
8. 用步骤 7 所确定的浓度的肽或蛋白质抗原的 PBS 或磷酸钠盐稀释液 50μl/孔包被 96 孔板。在 37℃的湿盒中孵育 2h 或在室温下孵育 18h（过夜）。
9. 清洗各孔并添加 100μl/孔的 1% BSA/PBS 溶液封闭没有特异结合的位点。在 37℃的湿盒中孵育 1h。
10. 清洗各孔并加入 25μl/孔的 1% BSA/PBS，向第一行的第 1～3 孔内加入对照抗原（含有相同数量的包被培养板的对照抗体）。再向第 4～6 孔和 7～9 孔分别加入 25μl/孔的 100×和 1000×的对照抗原。在培养板上设置 2 倍的倍比稀释浓度。10～12 列不含抑制剂代表 100%的抗体结合。
11. 向第 1、4、7 和 10 列加入 25μl/孔的稀释到最佳浓度的 MAb（步骤 7 测定）。再向 2、5、8 和 11 行加入 2×最佳浓度的抗体，3、6、9 和 12 行加入 0.5×最佳浓度的

抗体。在 4℃的湿盒中孵育 18h。

12. 清洗各孔并加入 50μl/孔的 HRP 偶联的二抗。在 37℃的湿盒中孵育 1h。清洗各孔，显影，按步骤 6 检测。
13. 检测三种抗体 IC_{50} 时的抗原浓度。选出 IC_{50} 值最低且信噪比≥10∶1 的抗体浓度。利用这些条件筛选出肽库（见基本方案 1 和 2）。

参考文献：Houghten *et al.*，1999；Pinilla *et al.*，1999

撰 稿 人：Clemencia Pinilla，Jon R. Appel，and Richard A. Houghten

［万涛（第十三章）］

第十四章　分子生物学

本章所选的方法都与免疫学相关。本章并不是提供分子生物学基础实验方法，实际上恰恰是需要读者已经具备这方面的丰富知识。分子生物学方面的知识可以参考“现代免疫学方法（CPI）”和“现代分子生物学方法（CPMB）”这两本书。在下面一些方法中提供了上面两本书相关章节的参考文献。

单元 14.1 介绍了一种受磷酸钙调节的能有效介导反转录载体质粒 DNA 进入细胞的反转录病毒包装系统的转染方法。

一旦 cDNA 被克隆，人们一般会把编码靶蛋白的基因连接到免疫球蛋白恒定区。构建 cDNA 序列与免疫球蛋白铰链区同一个读框的融合基因（单元 14.2）。一旦基因表达，这些免疫球蛋白嵌合蛋白形成二硫键连接的分泌形式的共价二聚体，可以通过蛋白 A 或者蛋白 G 微珠来纯化（单元 1.5）。在体内融合蛋白要比免疫球蛋白具有更好的生物学活性。该二聚体对 cDNA 编码蛋白的配体有很高的亲和力。而且，二聚体能结合细胞表面 Fc 受体，所以其生物学功能更为广泛。单元 14.3 描述了抗体噬菌体展示文库构建和筛选的最新进展。

单元 14.4 介绍了基于 PCR 技术检测 B 细胞发育过程中的同型转换。单元 14.5 的内容是用 PCR 检测稀有 mRNA。首先，反转录获得 mRNA 的拷贝 cDNA，通过 PCR 扩增获得大量的产物用以检测。这种方法尤其适用于细胞因子 mRNA 的检测，因为大多数的细胞因子都是在转录水平受到调节。该节表格中列举了一些扩增人和鼠细胞因子 cDNA 的 PCR 引物。单元 14.6 和单元 14.7 的内容分别为 PCR 对人或小鼠的 TCR 可变区基因进行定性和定量，通过 PCR 产物克隆和测序来研究表达基因的连接多样性。单元 14.8 是应用抗原谱/免疫扫描技术，更深入研究从小鼠到人类不同生物的 T 细胞受体库。抗原谱分析利用竞争性 PCR 从特异 TCR 可变区基因中扩增不同长度的重排 CDR3 cDNA 模板，扩增产物直接测序，即可确定重排序列。该节内容还包括产生和处理抗原谱分析所需起始材料的优化方案。

单元 14.9 提供了 RNA 酶保护实验方案，RNA 酶保护分析是一种敏感和定性的方法，检测 8～12 种基因的相对转录水平。虽然比不上 RT-PCR 敏感，但要比传统的 Northern 印迹方便和敏感。

端粒长度跟细胞存活和分裂细胞的复制活性有关。最后单元 14.10 的内容为目前用于研究小鼠和人细胞中的端粒长度和端粒酶活性的分析方法，包括检测端粒长度的电泳分析、定量荧光原位杂交（Q-FISH）和流式细胞仪 FISH 法（FLOW-FISH）。

撰 稿 人：David H. Margulies

单元 14.1　293T 细胞包装和扩增反转录病毒

基本方案 1　磷酸钙/DNA 沉淀瞬时转染 Phoenix 反转录包装细胞

此方法适用于亲嗜性（ecotropic）和双嗜型（amphotropic）Phoenix 包装细胞。

注：所有的溶液用无菌双蒸水或无菌 Milli-Q 超纯水（Millipore）配制。

材料（带√项目见附录 1）

75cm² 组织培养瓶中处于指数生长期的包装细胞（亲嗜性或双嗜型；见辅助方案 2）

√PBS 不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+}

0.05%（m/V）胰酶/0.53mmol/L EDTA

完全培养基：DMEM，10%（V/V）热灭活的 FBS，100U/ml 青霉素，100U/ml 链霉素，2mmol/L L-谷氨酰胺

50mmol/L 氯喹（PBS 配制，−20℃保存）

√2mol/L $CaCl_2$

1～2 mg/ml 反转录载体质粒经 CsCl 密度离心或者 Qiagen 试剂纯化（图 14.1.1 和图 14.1.2）

√2×HeBS（HEPES 缓冲盐），pH6.99

6cm 组织培养皿

15ml 无菌离心管（加盖，可旋紧）

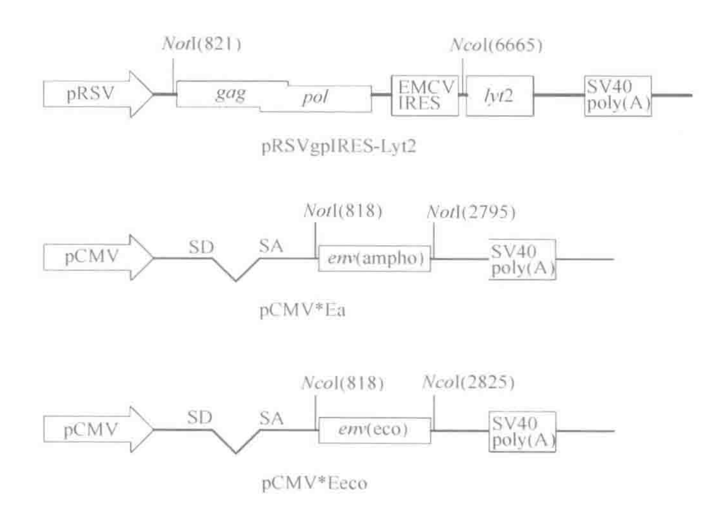


图 14.1.1　Phoenix 反转录包装所需的质粒。293T 细胞稳定转染 pRSVgpIRES-Lyt2 载体。通过流式细胞仪分选出 Lyt-2 表面蛋白高表达的克隆，命名为 Phoenix-gp（ΦNX-GP）。Phoenix-gp 克隆然后稳定转染其中一个包膜蛋白。通过稳定表达的包膜蛋白筛选。利用 pCMV* Ea 和 pCMV* Eeco 质粒分别构建 Phoenix 亲噬性（ΦNX-A）和 Phoenix 双嗜型（ΦNX-E）包装细胞。

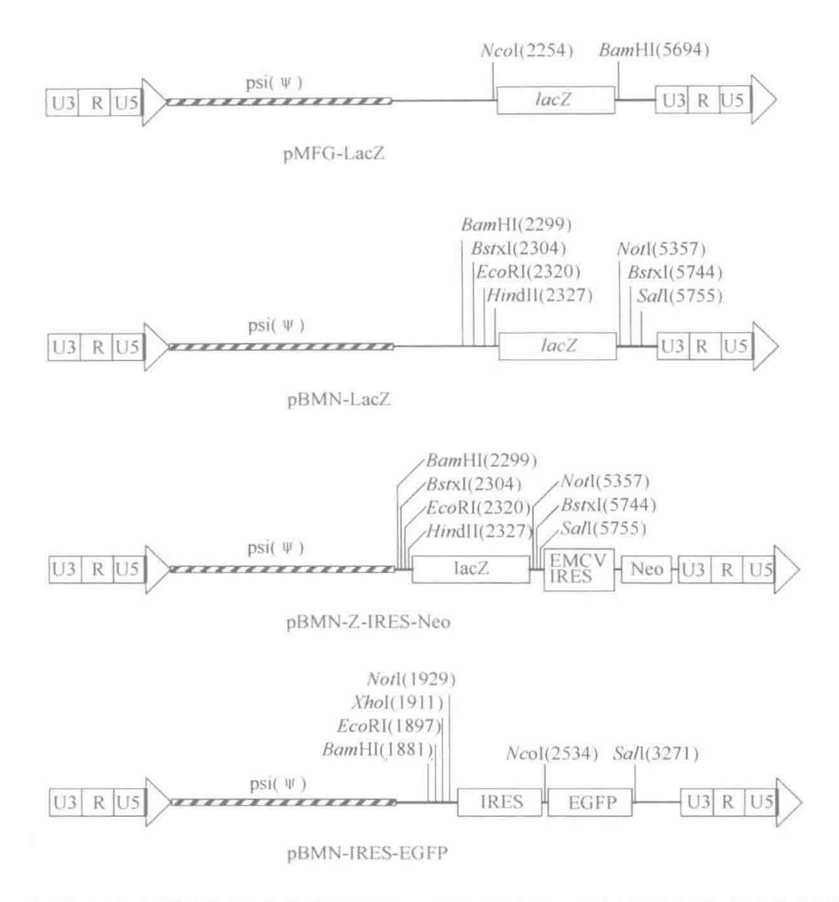


图 14.1.2　从 Phoenix 包装细胞扩增病毒所需的一些标准质粒。不同的连接位点允许靶基因的克隆，以及 DNA 文库或者是肽文库的构建。其中一些质粒的稳定表达克隆通过 G418 筛选或者通过流式细胞仪分选。EGFP，增强绿色荧光蛋白；EMCV，脑心肌炎病毒；IRES，内部核糖体插入位点。

1. 每瓶 $75cm^2$ 培养瓶的 Phoenix 细胞用 10ml PBS 轻轻洗一遍。弃去废液，加入 2ml 0.05%（*m/V*）胰酶/0.53mmol/L EDTA，置室温 5min。快速拍打瓶底直到形成单细胞悬液。加入 15ml 完全培养基终止胰酶反应。
2. 细胞计数（附录 3A），每个 6cm 培养皿中加入 3ml 完全培养基，含 2×10^6 个细胞，培养 24h，细胞汇合生长到 80%。
3. 所有的转染试剂在使用前放至室温。
4. 每个 6cm 培养皿加入 4μl 50mmol/L 氯喹（加入转染试剂后终浓度为 50μmol/L）。轻轻摇动平板，混匀。放入培养箱，12h 内加入 2×HeBS。

　　如果不需要得到最高滴度，只是为了比较不同克隆的相对滴度。最好不要使用氯喹。

5. 15ml 离心管中每管加入 61μl 2mol/L $CaCl_2$，然后用移液器将 5μg DNA 加在离心管的管壁。再加入 434μl 水，轻弹管壁使之混匀充分。
6. 向 $CaCl_2$/DNA 混合液加入 0.5ml 2×HeBS，用手动调节移液器充分混合。

　　第一次使用 HeBS，最好确定沉淀形成最佳吹打时间（2～20s）。

7. 用移液器把转染混合物逐滴加入氯喹处理过的6cm培养皿中。相差显微镜下观察细胞上面是否有沉淀物形成。
8. 37℃培养4～8h。
9. 小心地吸去培养皿中的培养基，加入4ml的新鲜培养基。培养至次日早上。
10. 再次更换培养基，32℃继续培养，这样可以降低细胞分裂次数，提高病毒颗粒的稳定性。
11. 48h和（或）72h后，轻轻吹起细胞，收集反转录病毒上清。最好使用新鲜的上清液感染，因为储存上清液的滴度会降低。

    转染24h后，包装细胞接近全部汇合生长。转染36h以上才能得到高滴度的反转录病毒。72h内每12h收集上清避免滴度损失。因此，必须及时补充新鲜培养基。假如反转录载体带有像GFP和β-半乳糖苷酶之类的标记，感染后48h就可以通过荧光显微镜和组织化学染色观察转染效率。整个系统优化后的转染效率达到50%以上。

    用新鲜的病毒上清感染受体细胞收获的反转录病毒滴度最高。如果上清不是在几小时内使用，应当放置冰上。冻融一次，上清病毒的滴度会下降一半。

备选方案1　水疱性口炎病毒G蛋白的假型反转录病毒

注意：操作VSV-G假型病毒体要非常小心。VSV-G假型病毒能把病毒体的感染性传递给人细胞。而且VSV-G假型病毒被用来表达已知的原癌基因，所以必须认真执行正确的法规监督。

附加材料（其他材料见基本方案1）

Phoenix-gp细胞系（见辅助方案2）

水疱性口炎病毒G蛋白（VSV-G）表达质粒：如pME-VSVG，或者pHCMV-G

1. Phoenix-gp细胞铺板，转染（见基本方案1，步骤1～2）。
2. 磷酸钙沉淀方法共转染5μg pME-VSVG（或者pHCMV-G）和5μg反转录病毒载体，用无菌双蒸水调节总体积为1ml（见基本方案1，步骤4～10）。

    VSV-G表达载体带有非常强的启动子，例如Sra（pME-VSVG）或者是CMV早期启动子（pHCMV-G）。整合到包膜脂质双层的VSV-G蛋白数量和细胞芽变产生的VSV-G蛋白呈正比。

3. 收集病毒上清（见基本方案1，步骤11）。离心，－80℃保存（见辅助方案1）。感染前用细胞培养基1∶100稀释。

辅助方案1　水疱性口炎病毒G蛋白假型反转录病毒的浓缩和低温储存

材料（带√项目见附录1）

水疱性口炎病毒G蛋白假型病毒Phoenix细胞的反转录病毒上清（见备选方案1）

√TSE溶液

0.45μm过滤器

Beckman L 系列超速离心机（或同等设备）

Beckman SW41 或 SW28 转子和离心管（70%乙醇清洗，层流净化柜中晾干）

1. 用 0.45μm 过滤器过滤收集病毒上清，检测回收率。
2. 转移到 Beckman 离心管中，用 SW28 或者 SW41 转子 4℃，50 000g 离心 3h。小心倒去上清，吸干剩余的液体。
3. 用 1/100～1/200 原体积，4℃放置 14～24h 的 TSE 溶液重悬沉淀。移液器轻轻混匀，−80℃保存 4 个月。

辅助方案 2　Phoenix 细胞的培养

材料（带√项目见附录 1）

Phoenix 亲嗜性、Phoenix 双嗜性和（或）Phoenix-gp 细胞系（http://www.stanford.edu/group/nolan/）

完全培养基：DMEM，10%（V/V）热灭活的 FBS，100U/ml 青霉素，100U/ml 链霉素，2mmol/L L-谷氨酰胺

√不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的 PBS

0.05%（m/V）胰酶/ 0.53mmol/L EDTA

冻存液，冰上放置：90%热灭活的 FBS/10%（V/V）二甲基亚砜（DMSO）

50mg/ml 匀霉素 B(hygromycin B)，PBS 配制

2mg/ml 白喉毒素，无菌水配制

75cm² 组织培养瓶

50ml 带盖锥底离心管

低速离心机

2ml 冻存管

冻存盒

1. 37℃，5% CO_2 的细胞培养箱中，每 75cm² 组织培养瓶含 20～30ml 完全培养基培养 Phoenix 亲嗜性、Phoenix 双嗜性和（或）Phoenix-gp 细胞。如果 24h 后裂解细胞，每瓶种植 1.0×10^7 个细胞；48h 后裂解细胞，4.5×10^6 个细胞/瓶；72h 后裂解细胞，2×10^6 个细胞/瓶；96h 后裂解细胞，1×10^6 个细胞/瓶。
2. 当细胞达到 80%～90%汇合生长，吸去上清，10ml PBS 轻洗。弃去，加入 2ml 0.05%胰酶/0.53mmol/L EDTA，室温消化 5min。快速拍打培养瓶直到形成单细胞悬液。加入 15ml 完全培养基终止胰酶反应。细胞计数并在培养瓶中种植适当数量的细胞培养（步骤 1）。
3. 冻存细胞：当细胞达到 80%～90%融合，消化细胞（步骤 2），计数，移至 50ml 带盖锥底离心管，4℃，500g 离心 3～5min。弃去上清，用预冷的冻存液重悬，细胞终浓度为 4×10^6 个细胞/ml。

   一瓶长满有 1.5×10^7～2.5×10^7 个细胞。
4. 每个冻存管中加入 1ml 冻存液，−80℃放置直到结冻，然后放入液氮罐保存。
5. 复苏细胞：75cm² 组织培养瓶加入 20～30ml 完全培养基。从液氮罐中拿出冻存管，

迅速放入37℃水中，不停摇动。用吸液器将冻存管中的细胞吸入含完全培养基的$75cm^2$培养瓶中，然后按照步骤1和2培养。

注意：做好脸部保护，防止冻存管内液氮迅速气化而发生爆炸。

6. 重新进行药物筛选，$75cm^2$培养瓶加入20ml含有200mg/ml匀霉素B和2μg/ml白喉毒素完全培养基，细胞密度为5×10^5。3～4d更换培养基。至少要筛选1周。

   推荐每隔几个月都要用药物进行筛选以保证包装蛋白的表达量。

基本方案2　感染贴壁细胞

材料

NIH 3T3细胞

成纤维细胞生长培养基（FGM）：如完全培养基：DMEM，10%（V/V）热灭活的FBS，100U/ml青霉素，100U/ml链霉素，2mmol/L L-谷氨酰胺

Phoenix产生的反转录病毒上清：亲嗜性或者双嗜性（见基本方案1）或者假型病毒（见备选方案1）；新鲜收集或者冻融（见辅助方案2），或者浓缩（见辅助方案1）

4mg/ml Polybrene（海美溴铵），或者5mg/ml硫酸鱼精蛋白（PBS配制，0.2μm过滤，4℃储存）

6cm组织培养皿

0.45μm过滤器

1. 在6cm培养皿加入3ml FGM，加入2×10^5处于指数生长期的NIH 3T3细胞。37℃，5% CO_2培养过夜。
2. 感染前，用0.45μm过滤器过滤新鲜收集的病毒上清。如果需要，室温，500*g*离心5min除去细胞碎片和活细胞。小心吸取上清到新管中，尽量避免碰到沉淀。在病毒上清中加入4mg/ml Polybrene（海美溴铵），或者是5mg/ml硫酸鱼精蛋白增加感染效率。
3. 吸去NIH 3T3的培养基，加入1ml反转录病毒上清。继续培养2～16h。

   如果有需要，5～6h内每小时用新鲜的病毒上清换液，可提高转染效率，特别是生长缓慢的细胞。根据靶细胞在聚阳离子复合物存在时的活力决定培养时间。
4. 吸去反转录病毒上清，加入4ml FGM。转染48h后检测靶基因的表达。

备选方案2　贴壁细胞快速（spin）感染（见基本方案2）

附加材料（其他材料见基本方案2）

带有平板支架的Beckman GS-6KR或者是Sorvall RT-3000B离心机

1. 在6孔板中加入1.5ml含1×10^5处于指数生长期的NIH 3T3细胞的FGM培养基。37℃，5% CO_2培养过夜。
2. 准备反转录病毒上清（见基本方案2中，步骤2和3）。
3. 吸去NIH 3T3的培养基，加入0.5ml反转录病毒上清。用Parafilm封口膜封住板口，室温，1200*g*离心1.5h。

   备选：新鲜分裂细胞可以像悬浮细胞一样直接重悬在病毒上清（见备选方案3）。

离心帮助细胞和病毒的立即接触。

4. 撕去 Parafilm 膜，放入 37℃培养箱培养 12～20h，1.5ml FGM 换液。
5. 转染 48h 后检测靶基因的表达。

备选方案 3 悬浮细胞的快速（spin）感染

附加材料（其他材料见基本方案 2）

处于对数生长期的 Jurkat 细胞（ATCC）
完全培养基：RPMI-1640，10%（*V/V*）热灭活的 FBS，100U/ml 青霉素，100U/ml链霉素，2mmol/L L-谷氨酰胺
Beckman GS-6KR 或者是 Sorvall RT-3000B 离心机
24 孔板
32℃培养箱

1. 准备反转录病毒上清（见基本方案 2 中，步骤 2 和 3）。
2. 室温，500*g* 离心 5min 沉淀处于对数生长期 Jurkat 细胞（5×10^5个细胞/孔）。
3. 每 5×10^5个细胞加入 1ml 病毒上清，种植到 24 孔板中。Parafilm 膜封好板口，室温，1200*g* 离心 1.5h。撕去 Parafilm，32℃培养箱培养过夜（12～16h）。

   不同细胞系的离心时间为 5min～1.5h，每次增加 15min 来确定最佳离心时间。

4. 次日收集 Jurkat 细胞，室温，500*g* 离心 5min。4ml RPMI-1640 完全培养基重悬后加到 6cm 培养皿，37℃继续培养 48h 以上。

单元 14.2 免疫球蛋白融合蛋白的构建

总策略

构建 Ig 嵌合体的表达质粒应当具有病毒来源的复制起始点，细菌复制起始点，抗生素抗性选择标记，编码免疫球蛋白恒定区 DNA 序列的真核启动子增强子，允许靶基因亚克隆插入的限制酶位点，Poly A 信号。假如 Ig 融合的蛋白质本身没有信号肽，Ig 表达载体应当提供 N 端分泌信号肽。修饰过的 CDM8 质粒含有上述所有的特征（图 14.2.1）。

理想连接方案应当设计成允许两个片段连接，意味着限制酶只能识别质粒一个位点，如果需要也可以三段连接甚至更多。靶基因和质粒决定使用限制酶的种类。特别要注意的，连接反应必须满足下列条件：①基因的 3′端必须带有能与编码免疫球蛋白融合的序列（靶蛋白和免疫球蛋白的读框必须一致）；②要扩增的靶基因不能有限制酶识别位点；③载体和插入靶基因结构必须允许靶基因的亚克隆。

基本方案 1 免疫球蛋白融合蛋白的构建

材料（带√项目见附录 1）

编码靶基因的 DNA

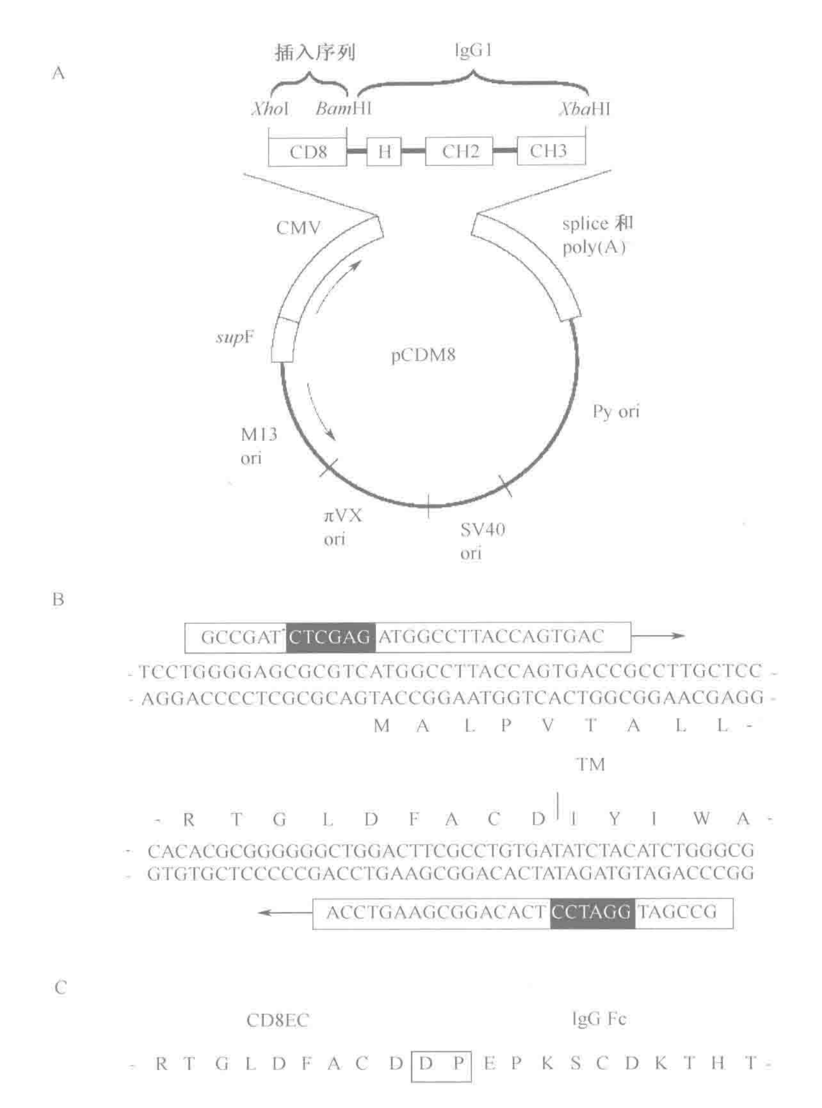


图 14.2.1　经过修饰的 pCDM8 表达质粒含有编码免疫球蛋白恒定区序列。插入序列编码 CD8 蛋白。(A) 带 IgG1 编码序列和 CD8 插入序列的 CDM8 质粒图谱。(B) CD8 基因部分序列，相应的氨基酸序列（下面），产生 CD8 嵌合体的引物（方框）。描黑的为 *Xho*I 和 *Bam*HI 酶切位点。(C) 融合蛋白部分序列：融合区的 *Bam*HI 位点编码两个氨基酸（天冬氨酸和脯氨酸）。EC，胞外区；Fc，铰链区，抗体重链的 CH2 和 CH3 区；TM，转膜区。

电转感受态 *E. coli* 细菌（如 CPI 单元 10.18，或者是 CPMB 单元 1.8）

寡核苷酸引物，3′端与待扩增 DNA 序列完全互补，5′端带有限制性内切核酸酶位点

√苯酚缓冲液

无水乙醇

√TE 缓冲液，pH7.5

4mol/L 乙酸铵

表达质粒（如修饰过的 pCDM8；图 14.2.2）

√T4 DNA 连接缓冲液，2×

T4 连接酶

√含选择性抗生素的 LB 培养基和平板

1. 100μl 含编码靶蛋白的 DNA 模板和正确引物的反应体系进行 PCR 扩增。取 10μl PCR 产物琼脂糖电泳检测。
2. 吸取 PCR 产物的水相到新的微量离心管，弃去矿物油，加入等量的苯酚缓冲液。振荡，高速离心使之分层。
3. 吸取上层水相到新的微量离心管。加入等体积的 4mol/L 乙酸铵和 2.5～3 倍体积无水己醇。−20℃放置 5～30min。离心 10～30min，沉淀 DNA 。弃去上清。离心机瞬时离心，尽量吸干残留液体。真空风干，加入 20μl pH7.5 TE 重悬。
4. 用相应的内切酶分别酶切 4μl PCR 产物和 0.5μg 质粒。反应体系为 10～20μl。酶切产物在低溶性凝胶上进行电泳。刀片切下载体和目的片段位置的凝胶，70℃溶解 2～10min。
5. 在冰上配制连接缓冲液：

   25μl 2×T4 DNA 连接酶缓冲液

   2.5U T4 连接酶

   17.5μl H_2O

   在微量离心管加入 7μl 胶溶解后的 PCR 产物和 3μl 胶溶解后的质粒；再加入 40μl 的连接酶缓冲液。15℃水浴过夜或者室温 2h 至过夜。
6. 如果有必要，70℃溶解凝胶。2.5～3μl 连接产物电穿孔转化 100μl 感受态细菌。转化的细胞在含相应抗生素的 LB 平板中 37℃培养过夜。
7. 在平板上挑取单个克隆，接种含有相应抗生素的 LB 培养基中培养过夜，碱裂解法小量纯化载体 DNA，20μl pH7.5 的 TE 缓冲液溶解 DNA。
8. 酶切反应筛选阳性克隆。最好通过测序反应确定 PCR 扩增过程中有无发生突变。

基本方案 2　免疫球蛋白融合基因分析

图 14.2.2 为分析免疫球蛋白融合蛋白的工作流程图。

材料（带√项目见附录 1）

COS 细胞（如 COS-7 细胞）或其他表达质粒的宿主细胞

√DMEM-10 完全培养基

DMEM-10，10% NuSerum（DMEM-10 完全 NS）

经纯化含有靶基因的表达质粒，重悬在 20μl TE 中，pH7.5（见基本方案 1）。

√PBS

DEAE-右旋糖酐/氯喹溶液：PBS 含 10mg/ml DEAE-右旋糖酐+2.5mmol/L 氯喹

10%（*V*/*V*）DMSO，PBS 配制

0.2%（*m*/*V*）胰酶/0.5mmol/L EDTA PBS 配制

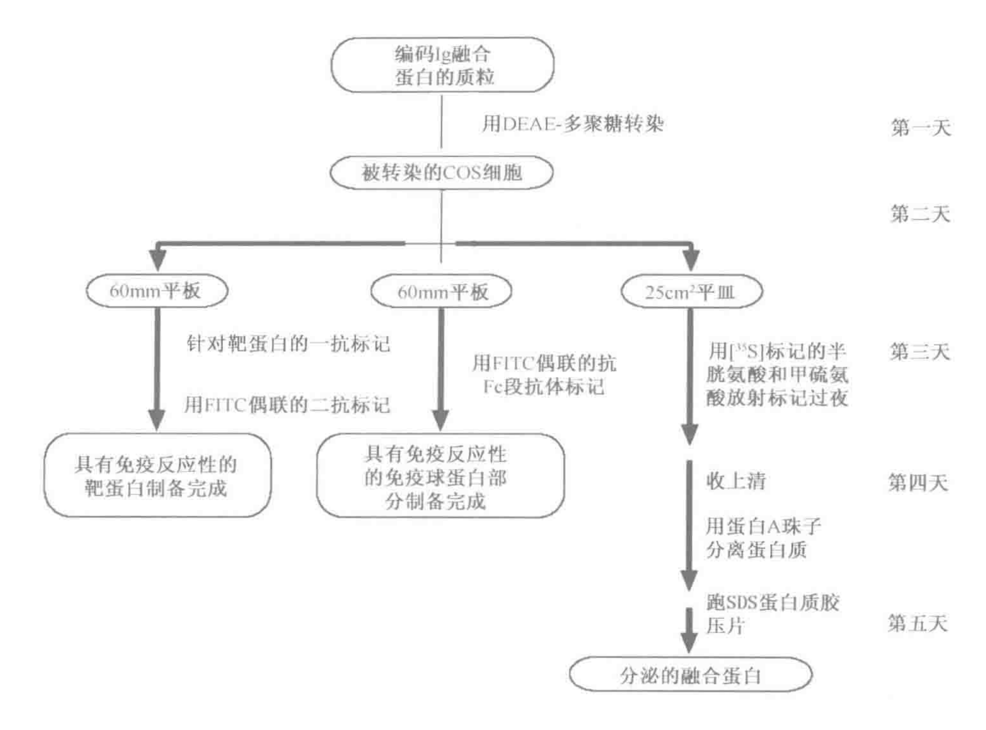


图 14.2.2　免疫球蛋白融合蛋白的表达、免疫反应、融合和分泌工作流程图。

2%（*V/V*）甲醛，PBS 配制

2%（*V/V*）甲醛 /0.1%（*V/V*）NP-40，PBS 配制

针对 Ig 恒定区的 FITC 偶联抗体（单元 4.1），浓度按照厂家推荐，DMEM-10 配制

1～2μg/ml 一抗（单元 1.3）或者 1∶100 稀释靶蛋白特异的腹水，DMEM-10 配制

针对一抗的 FITC 偶联二抗，DMEM-10 配制（单元 4.1），浓度按照厂家推荐

不含半胱氨酸和甲硫氨酸的 IMDM 或者 DMEM

^{35}S 标记的半胱氨酸和（或）甲硫氨酸，即可单独配制也可混合配制。

50%（*V/V*）蛋白 A 珠子，PBS 配制，含 0.1%（*m/V*）BSA 和 0.01%（*m/V*）NaN_3

0.1%（*V/V*）NP-40，PBS 配制

√1×SDS 样品缓冲液

^{14}C 标记的蛋白标准品

100mm 和 60mm 的组织培养平板

25cm^2 组织培养瓶

立式圆筒形混合机，旋转振荡器

免疫荧光显微镜

注意：在标记过程中挥发性的^{35}S 混合物会释放出来。

1. COS 细胞在 100mm 培养皿中生长达到 20%汇合度，每个 100mm 平板中加入 8ml 含细胞的 DMEM-10 完全培养基。不含细胞的培养基在下面的步骤里作为阴性对照。

培养过夜。

2. 吸去培养基，加入 5ml DMEM-10NS 完全培养基。除了阴性对照，每个平皿加入1～2μg 纯化的融合靶基因的质粒，混匀。再加入 0.2ml DEAE-右旋糖酐/氯喹。混匀，培养 3～4h。
3. 吸去培养基，加入 5ml 10% DMSO 的 PBS 溶液。室温放置 2min，弃去，加入 10ml 的 DMEM-10 完全培养基，培养过夜。
4. 吸去培养基，加入 10ml PBS 洗一次。加入 1.5ml 0.2%胰酶/0.5mmol/L EDTA，37℃放置 5～15min。加样器轻轻吹起细胞。
5. 分别在两个 60mm（含 3ml DMEM-10）培养皿和 1 个 $25cm^2$ 培养瓶（含 4ml DMEM-10）加入 500μl 步骤 4 收集的细胞，培养过夜。
6. 吸取 60mm 培养皿中上清，如果靶蛋白有特定的功能作为检测指标，可以检测上清确定有无融合蛋白的表达。

   假如结果为阴性，用更多的 DNA 转染细胞，培养几天收集上清检测。
7. PBS 洗两次，加入 2ml 2%甲醛，室温孵育 30min，吸去。再加入 2ml 2%甲醛 / 0.1%（*V*/*V*）NP-40，室温孵育 30min。PBS 洗两次。

   甲醇或者甲醇/丙酮溶液也可作为穿孔剂，而且能够保证在下面步骤中能被抗体识别的抗原表位不被破坏。
8. 其中一个平皿中加入 1.5ml 含有针对融合蛋白 Ig 恒定区的 FITC-标记抗体的 DMEM-10 完全培养基。另外一个加入 1.5ml 针对靶蛋白的一抗或者腹水的 DMEM-10 完全培养基稀释液。冰浴 30min，2ml PBS 洗两次。
9. 一抗孵育的平皿里再加入 1.5ml FITC 标记的二抗。冰浴 30min，然后 2ml PBS 洗两次。荧光显微镜下观察两块平皿的结果。

   虽然流式也能分析标记的 COS 细胞，但由于其较大的体积使流式分析有一定难度。每个平皿大概有 10%～50%的细胞被标记。假如针对靶蛋白的抗体不能标记细胞而抗免疫球蛋白重链抗体标记上细胞，可能因为 COS 细胞表达的靶蛋白不能跟抗体结合。如果抗免疫球蛋白重链抗体也不能标上，说明质粒构建存在问题。
10. 步骤 5 中培养瓶的细胞用 4ml PBS 洗一次。加入 2ml 不含半胱氨酸和甲硫氨酸的 IMDM 或者 DMEM，孵育 30min。加入 [^{35}S] 标记的半胱氨酸和 [^{35}S] 甲硫氨酸，终浓度为 150μCi/ml。旋紧瓶盖防止污染培养箱。培养过夜。
11. 收集转染细胞的上清，900*g* 离心 5min 去掉细胞碎片，上清移入新管中。
12. 在 500μl 标记上清中加入 100μl 蛋白 A 微珠，在立式圆筒形混合机上 4℃混匀 1h。
13. 瞬时离心，弃去上清，0.1% NP-40 洗 4 次。
14. 加入 100μl 1×SDS 样品缓冲液，煮沸 2min。取 20μl 电泳，放射自显影。
15. 假如 Ig 融合蛋白能跟抗体发生反应，并能分泌和具有一定的功能，可以大量的制备重组质粒，瞬时转染 COS 细胞或者获得 COS 稳定转染株。

参考文献：Gascoigne *et al.*，1987

撰 稿 人：Diane Hollenbaugh and Alejandro Arufo

单元 14.3　单链抗体的噬菌体展示技术

策略

图 14.3.1 为质粒图谱。表 14.3.1 为 PCR 扩增引物。扩增时在 *scFv* 基因的 5′端引入 *Sfi*I 酶切位点，3′端引入 *Not*I 酶切位点。pCANTAB5E 为商业化的噬菌体载体。

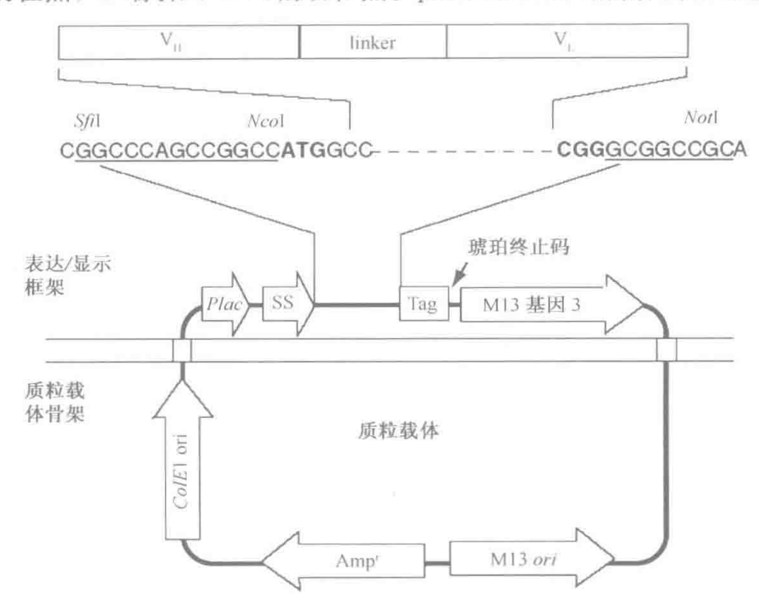


图 14.3.1　展示 scFv 的噬菌粒图谱（如 pCANTAB5E）。scFv 片段通过 *SfiI-Not*I 插入到质粒中，编码读框 5′端带 ATG 起始密码，3′端带 CGG 终止密码（粗体部分）。噬菌粒骨架含有下列元素：一个 *ColE*1 复制起始区和抗生素抗性标志（氨苄青霉素），丝状噬菌体复制起始区（保证噬菌体和辅助噬菌体感染细菌时通过滚环模型复制，并包装成噬菌体颗粒）。表达框架依次含有下列元素：一个可诱导启动子（lac 启动子），引导表达蛋白输送到细菌膜间隙组装成噬菌体颗粒的信号序列，酶切位点，scFv 编码读框，能被商业化抗体识别的多肽标签。TAG 琥珀终止密码。在噬菌体展示技术中，噬菌粒导入到带有 *supE* 琥珀抑制基因的 TG-1 菌，可以通读形成 scFv-P3 融合蛋白。另一方面，在不含琥珀抑制基因的菌株中，如 HB2151，此终止码被识别，scFv 在标签多肽基因前终止，被输送到细胞膜间隙（部分分泌到培养基中）。表达框架终止于编码噬菌体小包膜蛋白（P3）的 M13 基因 3。scFv 融合噬菌体小包膜蛋白使得 scFv 整合到噬菌体颗粒中，然后被表达出来。

表 14.3.1　克隆 scFv 噬菌体展示文库的引物

引物编号	引物名称	引物序列	混合物中的百分含量/%
第一次 PCR 中 VH5′端引物			
1	MuVH1-BACK	agccggcc atg gcc CAG GTY CAR CTG CAG CAG YCT GG	33
2	MuVH2-BACK	agccggcc atg gcc GAG GTY CAG CTG CAR CAR TCT GG	28
3	MuVH3-BACK	agccggcc atg gcc CAG GTG CAG CTG AAG GAG TCA GG	8

续表

引物编号	引物名称	引物序列	混合物中的百分含量/%
4	MuVH4-BACK	agccggcc atg gcc GAR GTG AAG CTG GTG GAR TCT GG	21
5	MuVH5-BACK	agccggcc atg gcc GAG ATC CAG CTG CAG CAG TCT GG	6
6	MuVH6-BACK	agccggcc atg gcc CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GG	4
7	MuVH7-BACK	agccggcc atg gcc SAG GTK MMK CTK VAR GAG TCW GG	
8	MuVH8-BACK	agccggcc atg gcc SAR GTN MWV CTG VWG SAR HCH GG	
5′端包含 *Sfi*I 位点(下画线)的第二次 PCR 及富集引物			
9	MuSfi-BACK	ATC TAT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC SAR RT	
第一次 PCR 中 VH 3′端引物			
10	MuJH1-FOR-S	CGA GGA GAC KGT GAS HGW GGT	75
11	MuJH2-FOR-S	CGA AGA GAC AGT RAC CAG AGT	25
12	MuJH3-FOR-S	CGA WCY HYD VTC ACH GTY TCY	
第二次 PCR 中 VH 3′端长引物，下画线为连接区中 *Bam*HI 位点			
13	MuJH1-FOR-L	ccagaaccgccaccgccggatccaccacctcc CGA GGA GAC KGT GAS HGW GGT	75
14	MuJH2-FOR-L	ccagaaccgccaccgccggatccaccacctcc CGA AGA GAC AGT RAC CAG AGT	25
15	MuJH3-FOR-L	ccagaaccgccaccgccggatccaccacctcc CGA WCY HYD VTC ACH GTY TCY	
第一次 PCR 中 Vk 5′端短引物			
16	MuVK1-BACK-S	SAM ATT GTK CTS ACH CAR TC	30
17	MuVK2-BACK-S	GAY ATC CAG ATG ACH CAR WC	18
18	MuVK3-BACK-S	GAT GTT GTG ATG ACC CAR AC	12
19	MuVK4-BACK-S	GAY ATT GTG ATG ACN CAG KC	25
20	MuVK5-BACK-S	GAT GTT TTG ATG ACC CAA AC	6
21	MuVK6-BACK-S	GAC ATC AAG ATG ACC CAG TC	5
22	MuVK7-BACK-S	GAC ATT GTG ATG TCA CAG TC	4
23	MuVK8-BACK-S	RRH RYY BWD MTV ACH CAR WC	
第二次 PCR 中 Vk 5′端长引物			
24	MuVK1-BACK-L	ggcggtggcggttctggtggaggtggatct SAM ATT GTK CTS ACH CAR TC	30
25	MuVK2-BACK-L	ggcggtggcggttctggtggaggtggatct GAY ATC CAG ATG ACH CAR WC	18
26	MuVK3-BACK-L	ggcggtggcggttctggtggaggtggatct GAT GTT GTG ATG ACC CAR AC	12
27	MuVK4-BACK-L	ggcggtggcggttctggtggaggtggatct GAY ATT GTG ATG ACN CAG KC	25
28	MuVK5-BACK-L	ggcggtggcggttctggtggaggtggatct GAT GTT TTG ATG ACC CAA AC	6
29	MuVK6-BACK-L	ggcggtggcggttctggtggaggtggatct GAC ATC AAG ATG ACC CAG TC	5
30	MuVK7-BACK-L	ggcggtggcggttctggtggaggtggatct GAC ATT GTG ATG TCA CAG TC	4
31	MuVK8-BACK-L	ggcggtggcggttctggtggaggtggatct RRH RYY BWD MTV ACH CAR WC	
第一次、第二次以及富集 PCR 中 Vk 区 3′端引物，下画线为 *Not*I 位点			
32	MuJK1-FOR	gccacctgcggccgc CCG TTT KAT YTC CAR YTT KGT SCC	75
33	MuJK2-FOR	gccacctgcggccgc CCG TTT CAG YTC CAG CTT GGT CCC	75
34	MuJK3-FOR	gccacctgcggccgc CCG YTT KAK YTC CAR YTT KGT NCC	25

图 14.3.2 为整个实验流程的时间表。建议实验过程从头到尾按照图示进行，尽量不要中断或延迟。在基本方案和辅助方案部分也提到了一些质量控制步骤。本单元的最

后为如何解决碰到的问题。

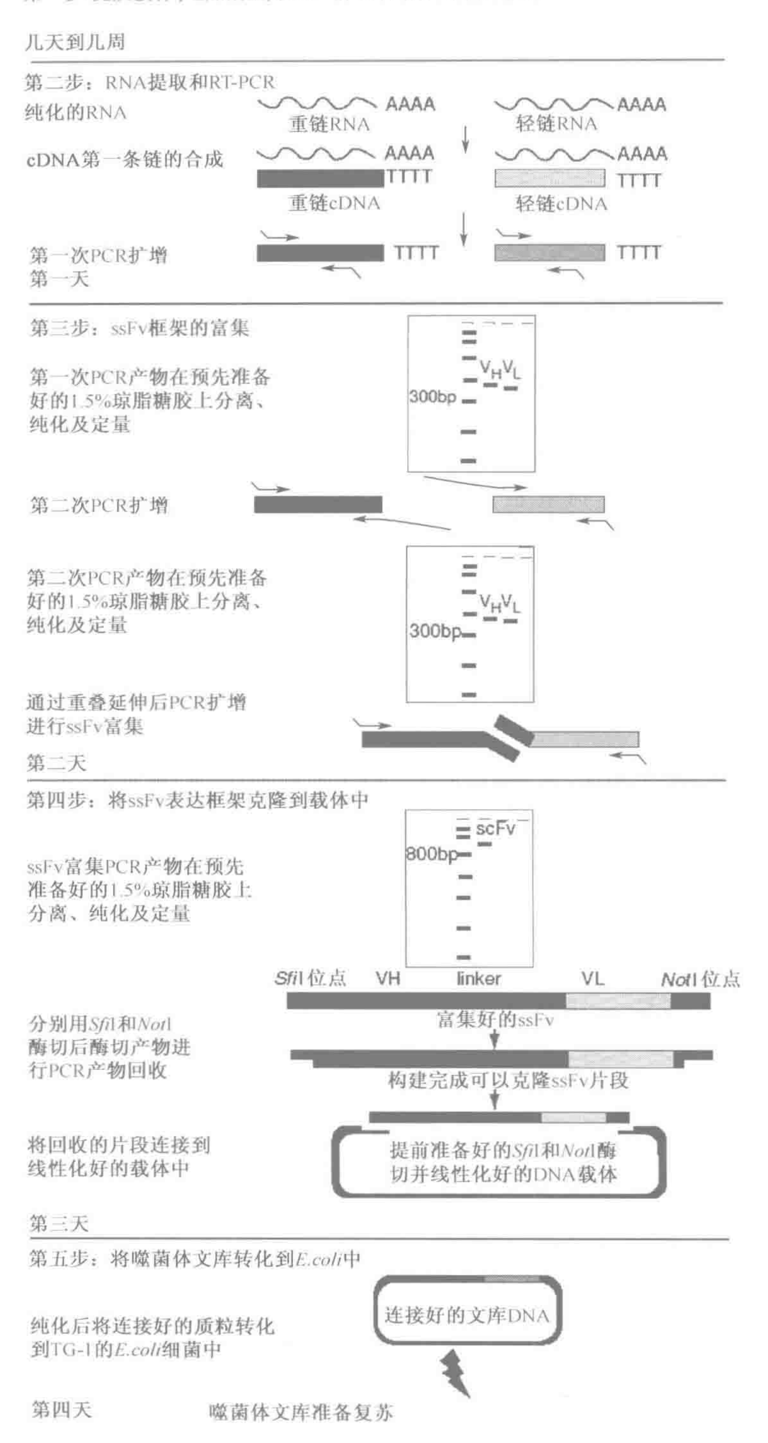


图 14.3.2　scFv 噬菌体展示文库的构建流程图。

基本方案 1 全套单链抗体噬菌体载体的构建

材料（带√项目见附录 1）

新鲜分离的小鼠脾脏或者 10^7 杂交瘤细胞（单元 1.3）
RNA 提取试剂
RT-PCR 试剂
√DEPC 水
寡核苷酸引物（表 14.3.1）
DNA marker
琼脂糖胶回收试剂盒（Qiaquick Gel Extraction kit，Qiagen）
√10mmol/L Tris · Cl，pH8.5
Vent DNA 聚合酶
dNTP（由 RT-PCR 试剂盒提供）
PCR 缓冲液（由 RT-PCR 试剂盒提供）
噬菌粒载体（如 pCANTAB5E）
限制酶 *Sfi*I、*Not*I 及相应缓冲液
BSA
T4 DNA 连接酶和 10×连接缓冲液
电转感受态菌 *E. coli* TG-1
√SOC 培养基
YTAG 琼脂平板：YT 培养基，2×（附录 1）含 0.4%葡萄糖，100μg/ml 氨苄青霉素
YTAG 培养基：YT 培养基，2×，含和不含 15%（*V/V*）甘油，100μg/ml 氨苄青霉素
PCR 仪
1.5ml 微量离心管
电穿孔仪器
0.2cm 容器
13cm 无菌离心管
接种环

1. 用 RNA 提取试剂盒提取脾脏或者细胞的总 RNA。溶解在 0.5ml DEPC 水中，作为 RT-PCR 模板。剩余的 RNA 分装成 50μl/管，−70℃保存。
2. 根据 RT-PCR 试剂盒说明配制 4 管 48μl 反转录反应体系，每管包含 20μg 的总 RNA，0.5μg oligo dT。95℃孵育 10min 后放于冰上终止反应。
3. PCR 扩增：每管加入下列引物混合物（表 14.3.1），引物的终浓度为 50pmol/50μl 反应体系，总体积为 2ml。

   管 1：引物 Mu-VH1-6-BACK（引物 No. 1～6，根据表 14.3.1 的比例混合）和引物 Mu-JH1-FOR（S）（引物 No. 10）。

管2：引物 Mu-VH1-6-BACK（引物 No. 1～6，根据表14.3.1的比例混合）和引物 Mu-JH2-FOR（S）（引物 No. 11）。

管3：引物 Mu-Vκ1-7-BACK（S）（引物 No. 16～22，根据表14.3.1的比例混合）和引物 Mu-Jκ1-FOR（引物 No. 32）。

管4：引物 Mu-Vκ1-7-BACK（S）（引物 No. 16～22，根据表14.3.1的比例混合）和引物 Mu-Jκ2-FOR（引物 No. 33）。

RT-PCR试剂盒的一个反应体系包括1×PCR缓冲液，0.2mmol/L dNTP，1～2U耐热DNA聚合酶。

4. 扩增参数如下：

1循环	5min	95℃	预变性
35循环	30s	95℃	变性
	1min	55℃	复性
	1min	72℃	延伸
1循环	5min	72℃	产物延伸

样品4℃保存。

5. 取5μl反应产物，1.5%胶电泳。准备胶回收和重新扩增。如果没有得到满意结果，参考表14.3.2。

反应1和2产物为350bp，而反应3和4为330bp。

注：表14.3.1列出的 Mu-VH7-BACK（引物 No. 7），Mu-VH8-BACK（引物 No. 8），Mu-JH3-FOR（S）（引物 No. 12），Mu-JH3-FOR（L）（引物 No. 15）为 V_H 的兼并引物。Mu-Vκ8-BACK（S）（引物 No. 23），Mu-Vκ8-BACK（L）（引物 No. 31），Mu-JK3-FOR（S）（No. 33）为Vκ的兼并引物。文库构建不需要这些引物，但当上述引物混合物扩增失败，可以考虑这些引物。这些引物导致抗体区末端发生突变，而这些突变会影响scFv的亲和力，所以不推荐。上述步骤中提到的引物不能通过RT-PCR扩增出某些特殊杂交瘤时，建议先确定重链和轻链的N端氨基酸序列以便设计相应的特异性引物。

表14.3.2　所有方案的疑难问题

问题	可能原因	解决方法
基本方案1		
第一次PCR没有产物	反转录或者PCR失败	用阳性对照模板检测试剂盒及试剂
	RNA模板质量不好或者降解	参考CPI单元10.11RNA提取正确的工作条件和注意事项
第一次PCR有非特异性条带	PCR反应没有优化	优化PCR反应：$MgCl_2$ 浓度，复性温度，其他条件。如果其他条带不是很亮，问题不大，因为通过胶回收获得正确的PCR产物
第一次PCR产物条带弥散	可能是引物和总RNA核苷酸复性	从总RNA中纯化mRNA，参考CPI单元10.11，基本方案8
组装PCR产生的scFv产量较低	PCR反应没有优化	优化PCR反应：$MgCl_2$ 浓度，复性温度，其他条件。同样的条件和引物扩增组装scFv

续表

问题	可能原因	解决方法
基本方案 1		
电穿孔转化几乎没有得到克隆	最后一步纯化可能丢失 scFv DNA	每步都要电泳定量 DNA。电泳比较连接产物和组成部分(质粒和插入 DNA)
	scFv DNA 没有充分酶切	在 2.5%胶上电泳,比较消化的 DNA 和未消化 DNA。20～40ng DNA 电泳会得到细亮的条带。可以分辨出几个碱基的差异
	电穿孔细菌质量不好	用 1～10ng 超螺旋质粒 DNA 作对照,检测细菌的转化效率
PCR 检测文库克隆,产物偏短(见辅助方案 2)	大多数克隆文库克隆丢失 scFv 插入	确保培养基含有葡萄糖(平板 0.4%,培养液 0.1%)除非像 YTAK 特殊要求
文库克隆的 PCR 和指纹法分析(见辅助方案 2),全部克隆显示 *Bst*NI 酶切图谱	scFv 克隆污染 PCR 反应	重组 DNA 过程中要严格操作。使用过滤枪头和一次性材料
基本方案 2		
第一轮富集基本没有得到克隆	TG-1 细菌丢失 F 鞭毛,不能被产出噬菌体感染,抗原包被没有成功	挑取小平皿 TG-1 细菌,培养要低于 37℃。优化 ELISA 包被和封闭缓冲液以及其他条件,免疫管也采用同样的条件
菌落太多(10^7)	免疫管没有充分封闭	优化 ELISA 包被和封闭缓冲液以及其他条件,免疫管也采用同样的条件
	噬菌体没有充分封闭可能会结合非特异性的抗原	用封闭液稀释噬菌体,免疫管也用同样的封闭液
	富集过程中洗涤不充分	增加洗涤次数,PBST 和 PBS 各 20 次
第二轮富集产出没有增加	正常,因为比第一轮洗涤更为严格	
基本方案 3		
3 或 4 轮富集后没有检测到阳性结合物	富集不充分	增加一轮富集。多克隆噬菌体 ELISA 验证阳性结合物的存在
单克隆噬菌体 ELISA 确定的阳性结合物在可溶性 scFv ELISA 中有信号	scFv 的筛选不够特异	很多 scFv 都会有这种问题,试试用细胞周质提取物代替待检培养基
辅助方案 3		
生物素化抗原和链霉亲和素包被珠子结合不充分	没有充分去除多余的生物素	凝胶过滤层析(G-25 柱,或者是 centricon 10/30 单位)去除未接合的生物素

6. 如果电泳结果正确，把剩下的 PCR 产物跑胶，切取靶基因所在的位置，V_H（第一管和第二管）产物大约为 350bp，V_K（第三管和第四管）产物大约为 330bp。进行胶回收。
7. 胶回收的 DNA 溶解在 50μl pH8.5 10mmol/L Tris · Cl 溶液里。
8. 回收 DNA 2 倍连续稀释，和大小一致并已知浓度的 marker 跑胶，在紫外透照仪下定量分析 DNA 片段浓度。

9. 重新扩增胶回收的 V_H 和 V_K：50μl PCR 反应体系包含下列试剂：

50ng 模板 DNA

50pmol/反应引物混合物，引物比例见表 14.3.1

1～2U 高保真性 DNA 聚合酶（如 Vent DNA 聚合酶）

0.2mmol/L dNTP

1×PCR 缓冲液。

除此之外，反应体系还应该包括：

V_H：

管 1：50ng 产物 1 作为模板，引物 Mu-VH1-6-BACK（引物 No.1～6）和 Mu-JH1-FOR（L）（引物 No.13）。

管 2：50ng 产物 2 作为模板，引物 Mu-VH1-6-BACK（No.1～6）和 Mu-JH2-FOR（L）（引物 No.14）。

V_K：

管 3：50ng 产物 3 作为模板，引物 Mu-VK1-7-BACK（L）（引物 No.24～30）和 Mu-JK1-FOR（L）（引物 No.32）。

管 2：50ng 产物 4 作为模板，引物 Mu-VK1-7-BACK（L）(引物 No.24～30）和 Mu-JK2-FOR（L)(引物 No.33)。

10. 扩增参数：

1 循环	5min	95℃预变性
30 循环	30s	95℃变性
	1min	55℃复性
	1min	72℃延伸
1 循环	5min	72℃产物延伸

样品 4℃保存。

11. 电泳胶回收 PCR 产物，定量（步骤 6～8）。

上述步骤扩增得到 V_H 库带 3′端的 2/3 连接肽，V_k 库带 5′端的 2/3 连接肽。通过重叠连接 PCR 组装可变区获得全套 scFv。

12. 组装反应如下（3～5 个统一装配获得大量的 scFv）：

模板：75ng 产物 1 和 25ng 产物 2，75ng 产物 3 和 25ng 产物 4。

引物：50pmol Mu-Sfi-7-BACK（L）（引物 No.9）和 37.5pmol Mu-JK1-FOR（L）（引物 No.32），12.5pmol Mu-VK2-FOR（L）（引物 No.33）。

50μl 反应体系包含 1～2U 耐热 DNA 聚合酶，0.2mmol/L dNTP，1×PCR 缓冲液。

13. 扩增设置参数：

1 循环	5min	95℃	预变性
30 循环	30s	95℃	变性
	1min	55℃	复性
	1min	72℃	延伸
1 循环	5min	72℃	产物延伸

产物 4℃保存。

14. 取 5μl 产物，1%琼脂糖凝胶电泳（750bp）。
15. 胶回收 PCR 产物，定量（步骤 6～8）。如果 scFv DNA 为唯一的条带，可进行 PCR 回收，DNA 溶解在 50μl pH7.5 10mmol/L Tris · Cl 溶液中。
16. 5U *Sfi*I 酶切 5μg 噬菌粒 DNA（如 pCANTAB5E）。BSA 终浓度为 0.1mg/ml。50℃孵育 3h 后，加入 5U *Not*I，37℃ 继续孵育 2h。其中 NaCl 的浓度为 100mmol/L。
17. 1%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。切取目标条带，胶回收，定量（步骤 6～8）。
18. 同步骤 16，酶切 scFv。无菌水代替洗脱液进行胶回收，DNA 溶于 22μl 无菌水。
19. 配制连接反应体系（5 份）：

    100ng *Sfi*I＋*Not*I 消化好的质粒 DNA

    80ng *Sfi*I＋*Not*I 消化并纯化好的 scFv

    2μl 10×连接缓冲液

    1μl T4 DNA 连接酶

    双蒸水补充至总体积为 20μl。

    根据厂家推荐黏末端连接温度和时间，16℃或者 4℃孵育 16h。
20. PCR 回收连接产物，无菌水代替洗脱液，最后用 50μl 无菌水溶解 DNA。
21. 制备电转的感受态菌 *E. coli* TG1（ CPI 附录 3N）或者是商业化的电转感受态菌 TG1，准备 20 个预冷的微量离心管，分别加入 100μl 电转感受态菌液 TG1，放在冰上。

    有些电转仪已经有预先设置的 E. coli 程序，如果没有的话，参数应设为 2.5kV，25μF，200Ω。
22. 准备 20 管电转反应体系，每管加入 2.5μl 纯化好的连接产物和 100μl 电转感受态菌液。加样器轻轻混合，冰上放置 40～50s。
23. 转移 DNA/细菌混合液到预冷的小槽内，立即放到电穿孔小室，冲击 4～5ms。取出小槽，立即加入 900μl 预热到室温的 SOC 培养基。用移液器上下混合，转移到 20 个无菌 13ml 离心管。37℃持续振摇孵育 1h（250r/min）。
24. 从每管中吸取 10μl 液体。10 倍梯度稀释，涂到含抗生素的 YTAG 琼脂培养平板上确定文库容量。30℃孵育 16h。
25. 每个离心管室温，5000*g* 离心 10min，100μl 新鲜的 SOC 培养基重悬沉淀。分别涂到 20 个 YTAG 平板（pCANTAB5E 质粒含氨苄青霉素抗性基因）。25℃孵育 16h。
26. 每块板子挑取单个菌落到 10ml YTAG 培养基。同步骤 25，离心收集细胞。10ml 含 15%甘油的 YTAG 培养基重悬。10 倍梯度稀释转化细胞，涂到 YTAG 琼脂培养平板上检测文库扩增程度 25℃培养过夜。其余分装 1ml/管，−80℃保存。

    文库应当含有 10^7～10^8 克隆。扩增后的文库应当含有 10^{10}～10^{11} 克隆形成单位（CFU）/ml。

    质量评估：在检测文库容量的平板中挑取 10～20 个分离良好的克隆作为 PCR 检测文库质量和差异的模板（见辅助方案 2）。如果是高质量的文库，每个克隆的 PCR 扩增产物都含有不同的限制酶酶切模式（RFLP）。

基本方案 2　scFv 展示噬菌体在抗原包被板上的亲和筛选

预先准备所有的仪器和试剂。配制细菌生长培养基和平板备用。根据推荐步骤 1 准备大量辅助性噬菌体。仔细阅读下面所列的步骤以便更好的安排实验计划。

材料（带√项目见附录 1）

生长在小平皿上的 TG-1 克隆
√YT 培养基，2×（不含抗生素和葡萄糖）
细菌文库甘油冻存液（见基本方案 1）
YTAG 培养基：2×YT 培养基，100μg/ml 氨苄青霉素和 1%（*m/V*）葡萄糖
helper phage（如 VCS-M13，Stratagene；M13KO7，Bio-Rad 见辅助方案 1）
YTAK 培养基：2×YT 培养基，100μg/ml 氨苄青霉素和 50μg/ml 卡那霉素
√PEG/NaCl
√PBS 含/不含 15%（*V/V*）甘油
TG-1 细菌
YTAG 培养平板：2×YT 培养基，100μg/ml 氨苄青霉素和 0.4%（*m/V*）葡萄糖
特异性抗原，PBS 配制
√碳酸氢钠缓冲液
2%（*m/V*）MPBS：PBS 含 2%（*m/V*）脱脂奶粉。4℃最长储存 48h
PBST：PBS 含 0.05%（*V/V*）Tween 20，室温保存
100mmol/L 新鲜配置的三乙胺
√1mol/L Tris · Cl，pH7.4
YT 培养基，2×，含 15%（*V/V*）甘油
4ml Maxisorp 免疫试管（Nunc），或者是高亲和力蛋白的 polystyrene 管子
13ml polystyrene 管

E. coli 细菌培养

1. 第一天：从小平皿上挑取 TG-1 菌落到 5ml 2×YT 培养基中，37℃持续振摇培养过夜。

   丝状噬菌体通过性菌毛感染 F^+ *E. coli*（如 TG-1 菌株）。*E. coli* 必须在 37℃培养处于对数生长期（OD_{600} 为 0.4～0.6），以保证性菌毛生长和转染效率。

2. 第二天：菌液 1∶100 稀释到 20ml 新鲜配制的 2×YT 培养基中。37℃持续振摇培养直至 OD_{600} 为 0.4～0.6。加入噬菌体感染。

   菌液可在 37℃储存几个小时。不要放在冰上，这样会导致 F 性菌毛丢失和感染效率降低。F′携带细菌，比如 TG-1 应当在琼脂糖平皿上培养（如 M9 培养基）以避免 F′丢失，造成细菌抵制纤丝状噬菌体的感染。

噬菌体文库的培养和复苏

3. 第一天：接种细菌文库储存液（约 1×10^{10} 个克隆）到 100ml 2×YTAG 培养基中，37℃持续振摇培养直至 OD_{600} 为 0.5（1.5～2h）。
4. VCS-M13 或者 M13KO7 辅助噬菌体感染细菌，比例为 1∶20（细菌数目∶辅助噬菌体颗粒，$1OD_{600}=2\times10^{8}$ 个细菌/ml）。37℃无振摇培养 30min，然后转入 37℃以 250r/min 的速度持续振摇继续培养 30min。
5. 转化细菌室温，3300*g* 离心 10min，100ml YTAK 培养基重悬细菌，30℃持续振摇培养过夜（250r/min）。
6. 第二天：4℃，8000*g* 离心 10min（或者 3300*g*，10min），转移上清到新的离心管。加入 1/5 体积的 PEG/NaCl。混匀，冰上放置 1h 以上。4℃，10 800*g* 离心 30min，弃上清，40ml 双蒸水重悬沉淀。加入 8ml PEG/NaCl，混匀，冰上放置 20min 以上。4℃，10 800*g* 离心 10min。小心吸去上清。再次瞬时离心，尽可能吸干残留液体。
7. 5ml PBS 重悬沉淀，室温，11 600*g* 离心 10min。噬菌体上清在 4℃可短期保存，在含 15%甘油的 PBS 中，－70℃可长期保存。新鲜复苏的噬菌体用来亲和筛选。
8. 噬菌体的冻存液用无菌 PBS 10 倍梯度稀释，检测滴度。梯度稀释的噬菌体（从 10^{7} 开始）感染 TG-1（步骤 2），两者混合 37℃培养 30min。感染的细胞涂到 YTAG 平板上，37℃培养过夜。噬菌体冻存液的滴度应当为 $10^{12}\sim10^{13}$ 个细胞/ml 。

生物富集：第一轮筛选

9. 第二天：4ml 抗原（10～100μg/ml 抗原，PBS 配制，或者 50mmol/L 碳酸氢钠 pH9.6 ）包被 Nunc 抗原管，4℃过夜（图 14.3.3）。
10. 第三天：PBS 快速洗三次，加满 2%MPBS 封闭。密封，室温或者 37℃孵育 2h（根据抗原的稳定性）。PBS 洗三次。
11. 加入 $10^{11}\sim10^{12}$ 复苏噬菌体到 4ml 2% MPBS。室温在旋转器上孵育 1～2h。每次清洗都要用缓冲液完全填满管子，然后快速吸干。第一轮筛选，抗原管用 PBST 洗 10 次，然后用 PBS 洗 10 次去除清洁剂。第二轮及后面的筛选，抗原管用 PBST 洗 20 次，然后用 PBS 洗 20 次。
12. 加入 1ml 100mmol/L 三乙胺，并继续在旋转器上孵育 30min，洗脱噬菌体。
13. 1ml 噬菌体洗脱液立即加到预先准备的含 0.5ml 1mol/L pH7.4 Tris · Cl 的管中快速中和。
14. 洗脱后，向免疫管中再加入 200μl pH7.4 的 1mol/L Tris · Cl，中和管子残余的噬菌体。旋转管子使得每部分都能接触到中和溶液。
15. 吸取步骤 2 中 9.25ml 处于对数生长期的 TG-1 细菌，加入 0.75ml 的已中和的噬菌体洗脱液，同时在免疫管中也加入 4ml TG-1 细菌。37℃静置 30min。
16. 收集 10ml 和 4ml 噬菌体感染的 TG-1 细菌。取 100μl 进行 $10^{4}\sim10^{5}$ 稀释。稀释液涂于 YTAG 平板。37℃培养过夜观测富集产出。
17. 剩下的 TG-1 细菌室温，3300*g* 离心 10min。1ml 2×YT 重悬细菌沉淀；分涂到 4 个 YTAG 平板。30℃培养过夜或者可以见到克隆为止。

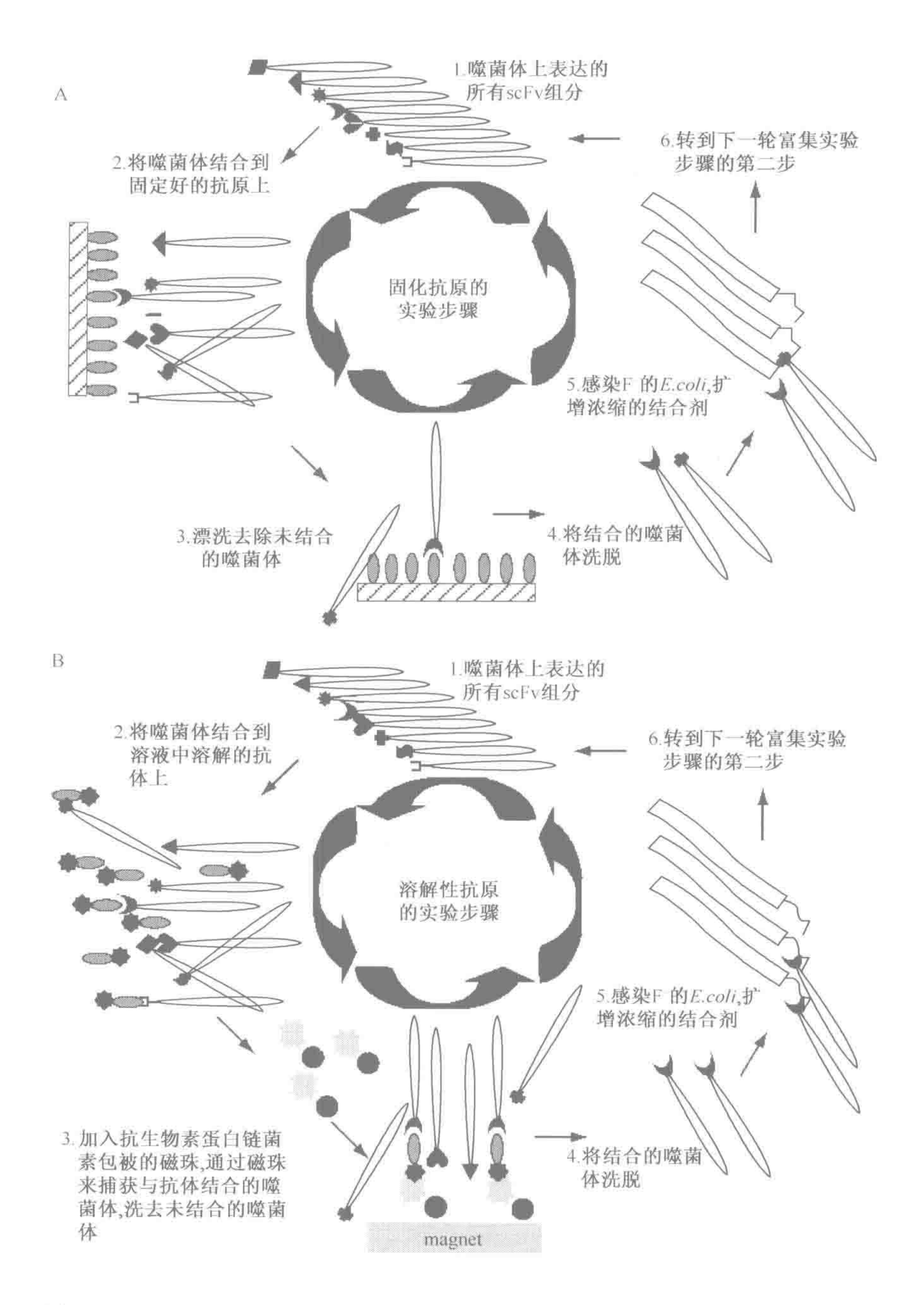


图 14.3.3　固相抗原亲和层析（A）或者是溶液中生物素化抗原富集 scFv 展示噬菌体（B）。

多轮富集

18. 第四天：在富集产出平板中加入 5～6ml 含 15%甘油的 2×YT 培养基，用接种环刮下细菌。吸取 50～100μl 菌液到 100ml YTAG 培养基，37℃持续振摇（250r/min）

培养直至 OD_{600}＝0.5（2h），剩下的菌液（产出1甘油冻存液）－70℃保存。

19. 10ml 菌液加入1/20（细菌数目/辅助噬菌体颗粒）辅助噬菌体。37℃ 孵育 30min，然后 37℃ 持续振摇培养 30min。感染的细菌室温，3300g 离心 10min。50ml YTAK 培养基重悬细菌，30℃持续振摇培养过夜。
20. 第五天：取 40ml 菌液 4℃，10 800g 离心 10min，转移上清到新的离心管。加入 1/5 体积（8ml）的 PEG/NaCl。混匀，冰上放置 1h 以上。4℃，10 800g 离心 10min。小心吸去上清。瞬时离心，尽可能吸干 PEG/NaCl 溶液。2ml PBS 重悬沉淀，4℃，11 600g 离心 10min，去除细菌碎片。
21. 滴度检测。1ml 噬菌体溶液进入下一轮富集筛选（input）。另外 1ml 4℃保存。
22. 重复以上富集筛选步骤 2 或 3 轮。每轮都要降低包被免疫管抗原的浓度。

    监测富集筛淘投入和产出的比例。下降的投入/产出比例表示成功的富集。多克隆噬菌体 ELISA 检测特异性富集。一轮富集筛选需要 2d。通常可以通过观察 PEG/NaCl 沉淀颗粒的大小估计噬菌体滴度，这样就不需要多等一天来确定滴度。

    每轮富集筛选得到的噬菌体种群结合特异性抗原，ELISA 确定噬菌体的多克隆抗体。ELISA 筛选噬菌体感染单细菌克隆，确定单克隆噬菌体抗体，电泳 *Bst*NI 酶切 PCR 产物（见辅助方案 2），最后对 scFv DNA 进行测序可评估筛选得到的噬菌体单克隆抗体的多样性。

备选方案　链霉亲和素包被的磁珠富集筛选生物素化抗原结合的 scFv 展示噬菌体

附加材料（其他材料见基本方案 2）

复苏噬菌体文库（见基本方案 2）
链霉亲和素偶联的 Dyna 磁珠（Dynal）
生物素化抗原（见辅助方案 3 或者 4）
含 0.1%（V/V）Tween 20 MPBS（见基本方案 2）
新鲜配制的 100mmol/L TEA（三乙胺），pH12
10mmol/L DTT

1. 复苏的噬菌体文库（10^{11}～10^{12}）和相同体积的 2% MPBS 在 1.5ml 微量离心管里混合（不超过 1ml）。室温在旋转器上孵育 60min。
2. 吸取 100μl 链霉亲和素偶联的 Dyna 磁珠到 1.5ml 微量离心管。第一轮筛选吸取 200μl 磁珠，因为要去除和避免链霉亲和素的结合剂。用磁棒把磁珠吸附在管壁。去除上清，磁珠重悬在 2% MPBS。室温旋转 1～2h，封闭磁珠。
3. 为了去除链霉亲和素的结合剂，首先噬菌体和链霉亲和素偶联的 Dyna 磁珠预孵育 1h。用磁铁把磁珠吸附在管壁，转移噬菌体到新的管子。加入 100～500nmol/L 的生物素化抗原与噬菌体抗体结合。在旋转器上室温孵育 30～60min。用磁铁把磁珠吸附在管壁，去除上清，含 0.1%Tween 20 的 250μl MPBS 重悬 Dyna 磁珠。
4. 在噬菌体-抗原混合物中加入 Dyna 磁珠，旋转器上室温孵育 15min。把管子放到磁性架子上，使得全部磁珠吸附在管子的一侧。上下前后颠覆管子，保证全部磁珠都

能被洗到。管子室温放置 1min。

5. 仔细吸干液体，用 1ml 含 0.1% Tween 20 MPBS 洗 6 次。
6. 液体转移到新的管子，用 1ml 含 0.1% Tween 20 MPBS 洗 6 次。转移到新管子，用 1ml PBS 洗 2 次。再次转移到新的管子。
7. 用 1ml 100mmol/L TEA（BirA 生物素化蛋白）或者 200μl 10mmol/L DTT（SS-生物素标记的蛋白质/多肽）。旋转器上室温孵育 5min，若用 TEA 洗脱磁珠上的噬菌体，洗脱液转移到含 0.5ml pH7.0，1.0mol/L Tris · Cl 的离心管中。倒置，迅速中和噬菌体。若用 DTT 洗脱下来的溶液，转到新的管子即可。
8. 洗脱下来的一半噬菌体感染 10ml TG-1 细菌。同基本方案 2，感染菌梯度稀释后涂到平板上，用板子包被的抗原进行筛选确定富集产出。剩余的磁珠和洗脱液 4℃保存 1 周。

一般来说，3～4 轮富集筛选足够分离抗原阳性的噬菌体。

基本方案 3　ELISA 鉴定抗原结合的 scFv 展示噬菌体

因为亲和层析经常产生非特异结合的噬菌体，必须用无关抗原做平行对照。所有的 ELISA 实验，预先确定最佳试验条件（单元 1.1）。原则上，最后一轮富集得到的克隆产生更多的阳性结合。然而，后面富集得到的噬菌阳性结合大多很低，甚至只有一个。推荐从第一轮富集筛选板子上挑取单独克隆，ELISA 检测噬菌体是否呈现多克隆抗体。

材料（带√项目见附录 1）

蛋白抗原
无关抗原（如 BSA）
√PBS 或者是碳酸盐包被缓冲液
MPBS：PBS 含 2%（*m/V*）脱脂奶粉或者 3%（*m/V*）BSA-PBS
PBST：PBS 含 0.05%（*V/V*）Tween 20
PEG 沉淀噬菌体冻存液（见基本方案 2）
HRP 偶联的抗 M13 抗体（Amersham Pharmacil Biotech）或者是兔源抗 M13 抗体和 HRP-标记的抗兔抗体
HRP 底物溶液（如 TMB 底物溶液，附录 1）
1mol/L 硫酸（H_2SO_4）
富集产出板子（见基本方案 2）
YTAG 培养基：2×YT 培养基，100μg/ml 氨苄青霉素和 1%（*m/V*）葡萄糖
甘油
含有 4×10^{10} PFU/ml 辅助性噬菌体的 YTAG 培养基
YTAK 培养基：2×YT 培养基，100μg/ml 氨苄青霉素和 50μg/ml 卡那霉素
E. coli HB2151 细菌
YTGN 培养基：2×YT 培养基（附录 1），1%（*m/V*）葡萄糖 100μg/ml 萘啶酸
YTAGN 培养平板和培养基：2×YT 培养基，100μg/ml 氨苄青霉素和 1%（*m/V*）葡萄糖，100μg/ml 萘啶酸（4℃储存不超过一周）

√2×YT 培养基含 9mmol/L IPTG

抗 myc 9E10 单克隆抗体（pHEN-1 或 pHEN-2）或是抗 E-标签单克隆抗体（pCANTAB5E）

无菌 96 孔平底平板

多头移液器

ELISA 读板器

板子离心机

ELISA 鉴定多克隆噬菌体

1a. 在半块 96 孔板中加入 100μl 蛋白抗原/每孔（10～100μg/ml，PBS 配制或者是碳酸盐包被缓冲液）。4℃过夜。另 48 孔加入同样浓度的无关抗原（如 BSA）。

2a. PBS 洗三次。吸水纸上拍干液体，加入 250μl MPBS 或者是 3% BSA-PBS 37℃封闭 2h。

3a. PBS 洗三次，在吸水纸上拍干液体。加入 100μl PBST。

4a. 第一排加入 50μl 复苏的富集噬菌体和每轮富集的 PEG 沉淀噬菌体（约 10^{10} CFU，见基本方案 2）。设置 2～3 个复孔，混匀，用多道移液器吸取 50μl 到下一排（3 倍稀释）。每排更换枪头。重复直到吸去第 7 排 50μl 溶液。第 8 排为空孔。

5a. 室温孵育 1～2h，弃去上清，PBST 洗三次，再用 PBS 洗三次。

6a. 加入 PBST 稀释的 HRP 偶联抗 M13 抗体或者是兔源 M13 抗体和 HRP 标记的抗兔抗体（推荐 1∶5000 稀释）。室温孵育 1～2h，PBST 洗三次，再用 PBS 洗三次。

7a. 每孔加入 100μl HRP 作用底物。室温孵育 10～30min，直至出现蓝色克隆，加入 50μl 1mol/L H_2SO_4终止反应，颜色变黄。ELISA 读板器上 450nm 测定 OD 值。

阳性信号：至少是空白板子的 3 倍标准差。如果是成功的富集筛选，每一轮的富集信号应该逐渐增强。如果是这样，可以分离单个抗原结合的 scFv 展示噬菌体。

ELISA 鉴定单克隆噬菌体

1b. 从已经选出的富集筛选轮次的输出板子挑取单个克隆到含有 100μl YTAG 的无菌 96 孔板。30℃持续振摇（150r/min）过夜。

2b. 吸取小量（大约 10μl）到第二块每孔含有 200μl YTAG 的 96 孔板。37℃持续振摇孵育 1h。第一块 96 孔板每孔加入终浓度为 15%的甘油，－70℃作为原板储存。

3b. 第二块 96 孔板每孔加入 25μl 含 10^9 PFU 辅助噬菌体的 YTAG 培养基，37℃ 孵育 30min，然后 37℃ 持续振摇孵育 1h（150r/min）。室温，1800*g* 离心 10min。弃去上清。

4b. 200μl YTAK 培养基重悬细菌，30℃持续振摇孵育过夜（150r/min）。

5b. 抗原包被 ELISA 板子（步骤 1a），洗涤和封闭 ELISA 板子（步骤 2a～3a）。

6b. 板子室温，1800*g* 离心 10min。加入 100μl 噬菌体上清（同步骤 4a，但不需要稀释）。无关抗原 BSA 的结合检测如下。

7b. 每个待检的噬菌体平板，都需两块 ELISA 板子，每块 ELISA 板子一半包被抗原，另一半包被无关抗原。封闭和洗涤，无关抗原孔中加入 100μl PBST。然后加入

100μl 复苏的噬菌体（来自于浓缩的噬菌体平板）。用加样器轻轻混匀，转移 100μl 到相应抗原包被孔中。同步骤 5a～7a，孵育，洗涤，测 OD 值。

ELISA 产生和检测可溶性 scFv

该方案可以取代或者平行于 ELISA 检测抗原结合的单个克隆。

1c. 在 YTGN 培养基中准备好处于对数生长期的 *E. coli* HB2151。取 10μl 每轮富集并已中和的噬菌体洗脱液，感染 200μl 对数生长期 HB2151 细菌，37℃，30min。取 0.1μl、1μl、10μl 和 100μl 感染细菌涂于 YTAGN 平板，30℃孵育过夜。

2c. 挑取单个克隆到含 100μl YTAGN 的 96 孔板中，37℃持续振摇过夜（150r/min）。培养过程中可通过放置在加湿摇床来防止液体干掉。

第一块 96 板加入终浓度为 15%的甘油，－70℃作为原板保存。

3c. 转移 5μl 到第二块含 200μl 新鲜配制的 2×YTAGN。37℃持续振摇培养（150r/min），直至 OD_{600} 达到 0.9（2～3h）。

4c. 当菌液 OD_{600} 达到要求后每孔加入 25μl 含 9mmol/L IPTG（终浓度为 1mmol/L）的 2×YT 培养基。30℃持续振摇培养 16～24h。

5c. 每孔加入 100μl 蛋白抗原（10～100μg/ml，PBS 配制或者是碳酸盐包被缓冲液）来包被 ELISA 板子，4℃过夜。无关抗原作为平行对照。洗涤，封闭 ELISA 板子。

6c. 板子 1800*g* 离心 10min，加入 100μl 含有可溶性 scFv 的上清。室温孵育 1～2h。弃去上清，PBS 洗三次。

7c. 加入 100μl PBST 配制 4μg/ml 抗 myc 9E10 单克隆抗体（噬菌粒 pHEN-1 或者 pHEN-2 表达带 myc 标签的 scFv）或者是抗 E-tag 抗体（pCANTAB5E）和 HRP 偶联的抗鼠抗体（1∶500～1∶5000 稀释）。室温孵育 1～2h。PBST 洗三次，再用 PBS 洗三次。

8c. 加入 100μl HRP 作用底物。终止反应和检测 OD 值（步骤 7a）。

不管是噬菌体 ELISA 还是可溶性 scFv ELISA 鉴定的阳性单克隆菌落。原板都作为进一步实验所需阳性克隆的来源。

辅助方案 1　辅助噬菌体冻存液的配制

因为丝状噬菌体不能溶解宿主菌，噬斑实际上是感染细菌由于生长缓慢，在未被感染的细菌形成浑浊背景上的环带。新鲜配制的平板和顶层琼脂才能获得噬斑，或者因为辅助噬菌体（VCS-M13 和 M13KO7）具有卡那霉素抗性，可以在抗性琼脂糖平板上得到分离良好的卡那抗性的菌落，得出噬菌体滴度（CFU），而不是通过噬斑得到滴度（PFU）。然而，还是推荐先用噬斑实验，确保辅助噬菌体携带所有的完成噬菌体生命周期和噬菌粒复苏的必需基因。

材料（带√项目见附录 1）

E. coli TG-1 细菌

辅助噬菌体

√YT 培养基，2×，顶层琼脂，平板

卡那霉素

√TE 缓冲液

2L 培养瓶

0.45μm 过滤器

1. 10μl 10 倍梯度稀释的辅助噬菌体（为了得到分离良好的噬斑）感染 200μl OD_{600} 大约为 0.2（早期指数扩增区）*E. coli* TG-1 细菌，37℃培养 30min。感染菌加到 3ml 已融化的 YT 配制的顶层琼脂（50℃），立即倒入温热的 YT 平板。等到顶层琼脂凝固，37℃培养过夜。
2. 挑取分离良好的小噬斑到 3～4ml 处于对数生长期的 TG-1 细菌中。37℃持续振摇培养 2h。
3. 上述菌液接种到含 500ml 2×YT 培养基的 2L 培养瓶中，37℃持续振摇 1h。加入终浓度为 50μg/ml 的卡那霉素，37℃继续培养 8～16h。
4. 转移菌液到离心管，4℃，10 800*g* 离心 15min。在噬菌体上清加入 1/5 体积的 PEG/NaCl，冰浴至少 30min。4℃，10 800*g* 离心 15min。2ml pH7.0 TE 缓冲液重悬沉淀。0.45μm 过滤器过滤。
5. 上述液体 10 倍梯度稀释感染对数生长期的 TG-1 细菌，检测滴度。稀释成终浓度为 10^{12} PFU/ml，分装成 0.5ml/管，－20℃可保存 1 年。

辅助方案 2　指纹图谱和 PCR 检测克隆的正确性和多样性

附加材料（其他材料见基本方案 1）

噬菌粒特异 PCR 引物

*Bst*NI（NEB）限制酶，或者是同切点酶 *Mva*I

1. 0.5ml 微量离心管中加入 20μl 双蒸水（分析 10～20 个克隆）。
2. 移液器挑取分离良好的克隆（文库容量测定平板，产出-滴度测定平板或者是重划的阳性克隆平板）到上述离心管中，移液器上下吹打，使之混匀。95℃ 放置 5min，热激。4℃，微离心 5min。
3. 取 5μl 作为 PCR 反应模板，50μl PCR 反应体系包括 1～2U DNA 聚合酶，1×PCR 缓冲液，0.1mmol/L dNTP，20pmol 引物。

   引物应当匹配 scFv 插入位点前 50bp 和后 50bp 的质粒序列。这些引物也可用于插入 scFv 片段的测序。

4. PCR 扩增参数

1 循环	5min	95℃	预变性
30 循环	30s	95℃	变性
	1min	55℃	复性
	1min	72℃	延伸

   样品 4℃保存。

5. 取 5μl 产物，1%琼脂糖电泳鉴定（859～900bp）。
6. 酶切 5μl PCR 产物。20μl 反应体系含有 2.5U *Bst*NI。60℃酶切 1h。如果是 *Mva*I，

37℃酶切 1h。2.5%琼脂糖电泳，观察是否为特异的 scFv 条带。

辅助方案 3　蛋白质的生物素化（NHS-SS-生物素）

附加材料（其他材料见基本方案 2，带√项目见附录 1）

蛋白质或多肽
√碳酸氢钠缓冲液
2-(生物素化）乙基-1，3 二硫代丙酸盐丁二酸亚胺酯（NHS-SS-生物素；Pierce）
√0.1mol/L 磷酸钠缓冲液
0.1%叠氮钠
生物素 BSA（Sigma-Aldrich）
过氧化氢酶偶联的链霉亲和素（Dako）
3，3-二氨基联苯胺-四盐酸精胺（DAB；Sigma-Aldrich）
Centricon 30 或者是 Centricon 10（Amicon）
透析袋

1. 在干净的管子内加入 1ml 碳酸氢钠缓冲液，溶解 1mg 蛋白质。
2. 溶解 40mg NGS-SS-生物素到 1ml 双蒸水中（66μmol/ml）。
3. NGS-SS-生物素按照不同的摩尔比加到蛋白质溶液中（1∶1、1∶5、1∶10、1∶20）。冰浴 2h 或者室温孵育 30min。
4. PBS 4℃透析过夜去除未结合的生物素，或者直接进入步骤 5。
5. Centricon 30 或者是 Centricon 10 离心过滤装置（根据分子质量）4℃，5000*g* 离心 15～30min。pH7.0 的 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液稀释样本。
6. 重复步骤 5 三次。加入 0.1%（*m*/*V*）的叠氮钠。生物素化蛋白 4℃可保存 7d，−70℃保存时间更长。
7. A_{280} 测定蛋白质浓度。同已知摩尔比的生物素-BSA（每个 BSA 分子带 10 个生物素）相比较，估计生物素化效率（生物素/分子的摩尔比）。

辅助方案 4　利用生物素-蛋白连接酶使蛋白生物素化

通过特异亲和力质粒或者是重组 DNA 方法，如 PCR 或是点突变加入标签，生物素标签能够加在所有靶蛋白的 N 端或 C 端，或者是外环。推荐的 N 端标签为 N′-MSGLMDIFEAQKIEWHE-C′，推荐的 C 端标签为 N′-GGGLNDIFEAQKIEWHE-C′。关于 BirA 标签的序列参考 Avidity 网站：http://www.avidity.com.

附加材料（其他材料见辅助方案 3）

靶蛋白
Biomix A（10×：0.5mol/L 甘氨酸缓冲液，pH8.3；Avidity）
Biomix B（10×：100mmol/L ATP，100 乙酸镁，500μmol/L D-生物素；Avidity）
生物素连接酶（Avidity）
MPB-生物素（Avidity）

Centricon 10 或者 30 离心过滤装置。

1. pH8 的 10mmol/L Tris · Cl 缓冲液配制浓度为 40μmol/L 的靶蛋白溶液。

   NaCl、甘油和硫酸铵会抑制 BirA 酶活性。

2. 反应体系如下：1 份 Biomix A，1 份 Biomix B，8 份底物溶液，室温孵育 1～12h。
3. PBS 4℃透析过夜，去除未结合的生物素，或者直接进入步骤 4～5。
4. 在 Centricon 30 或者是 Centricon 10 离心过滤装置（根据分子质量），4℃，5000g 离心 15～30min。pH7.0 的 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液稀释。重复三次。加入 0.1%的叠氮钠。生物素化蛋白 4℃可保存 7d，－70℃保存时间更长。
5. A_{280}测定蛋白质浓度。100%生物素化效率的 BirA 生物素化多肽，MPB-生物素（每个分子带一个生物素分子）作为标准，估靶蛋白生物素化效率（生物素/分子的摩尔比）。

参考文献：Hoogenboon *et al.*，1998

撰 稿 人：Itai Benhar and Yoram Reiter

单元 14.4　整体培养中同型转换重排的 PCR 检测

基本方案 1　通过转换接头的直接 PCR

以 B 淋巴细胞分离的 DNA 作为 PCR 模板，引入引物到目的转换区两侧（图 14.4.1）。

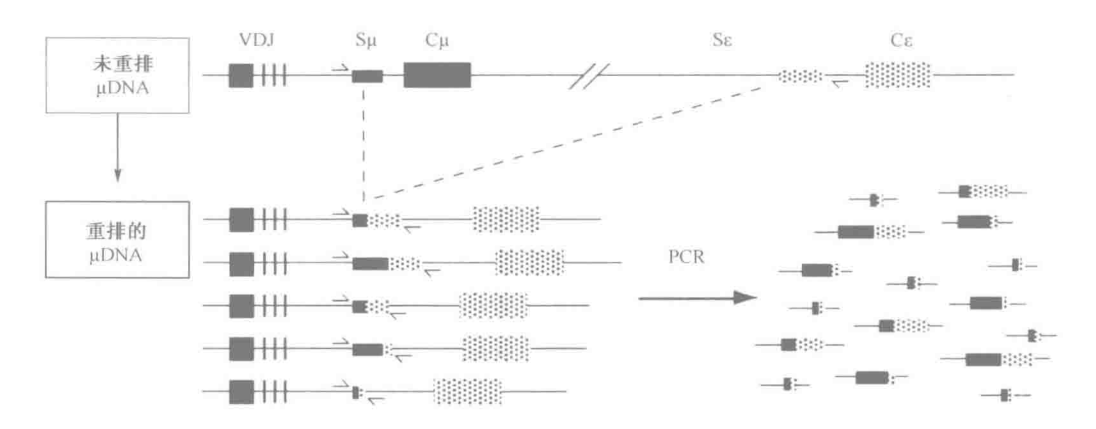


图 14.4.1　直接 PCR 检测 μ-ε 转换重组。顶排为涉及 μ-ε 转换重组的人免疫球蛋白位点框架：装配好的 VDJ 区，两个恒定区（Cμ-Cε），两个转换区（Sε-Sμ）。

材料（带√项目见附录 1）

外周血分离的单核细胞（PBMC；单元 8.1）

√IMDM-10 完全培养基

重组人 IL-4（rhIL-4；表 5.0.1）

含1%胎牛血清（56℃灭活1h）的PBS（FCS/PBS），冰上预冷

抗CD19磁珠（Dynal）

√PBS

10mmol/L Tris · Cl（pH8.0）/10mmol/L EDTA

10%（*m/V*）SDS

3mol/L乙酸钠，pH5.0

20mg/ml蛋白酶K（分装冻存于－20℃）

√苯酚缓冲液

25∶1（*V/V*）氯仿/异戊醇

95%和70%乙醇

√TE缓冲液

2.5μmol/L寡核苷酸引物（图14.4.2A；溶于无菌水，2.5pmol/μl，－20℃保存）

√10×直接PCR扩增缓冲液

无菌水

矿物油

2.5U *Taq* DNA聚合酶

√预杂交溶液

PCR扩增的^{32}P标记探针（见辅助方案）

2×SSC/1%SDS/10mmol/L EDTA

0.1×SSC/1%SDS/10mmol/L EDTA 15ml的圆底离心管

Beckman J-6离心机和配有15ml适配管的JS-4.2转子（或同等设备）

振荡器

稀有元素钴磁石0.6in×0.6in×2.5in

0.5ml微量离心管，高压灭菌

滤网枪头（欧洲实验室）

PCR仪

Immobilon-N或PVDF膜

65℃振荡的水浴箱

1. 外周血细胞以2×10^6个细胞/ml的密度悬浮于IMDM-10完全培养基。实验组的培养基中每毫升加入20U人重组IL-4，而对照组的培养基中不加人重组IL-4。

   其中FCS的用量很大程度上影响了IgE的表达，所以建议先按浓度梯度进行实验。

2. 每隔24h取25ml细胞悬液（5×10^7个），共取7次；用10ml预冷的FCS/PBS洗两次（将细胞悬液置于15ml离心管中，4℃，1000*g*离心5min）。每个时间点的细胞都按步骤3～6处理。

   转换重组在第三天可以检测到，在第四天达到稳定。

3. 用5ml预冷的FCS/PBS悬浮细胞沉淀于15ml离心管中，记数活细胞，以每个B细胞加3个磁珠的比例加入抗CD19磁珠（假定B细胞大约占所有淋巴细胞的10%）。

A 人Sμ-Sε转换区直接PCR引物

转换区扩增

```
                 XbaI
5'Sμ       ggccTCTAGACAAGGGGACCTGCTCATTTTTATC
           Mills等(1990)描述的Sμ的1～30位核苷酸序列

                 EcoRI
3'Sε       ggccgaattcAGTGCGGTCTGTACAGCGTGGC
           Ueda等(1982)描述的Sμ的527～508位核苷酸序列
```

人Sμ5′端316bp探针的扩增

```
                 BamHI
NPS-AR     ggccggatccGCACAGGCTCCTAAATTCTTGG
           Mills等(1990)描述的Sμ的34～55位核苷酸序列

F14        AGTTTAGCCATCTGAGTCCATTTCT
           Mills等(1990)描述的Sμ的349～325位核苷酸序列
```

B 鼠Sμ-Sγ1转换区DCPCR引物

转换区扩增

```
                 SalI
CPA5M-B    ggccggtcgacGGAGACCAATAATCAGAGGGAAG
           EcoRI的3′端Sμ上游94bp的MUSIGCD07核苷酸的3680～3658位

                 ClaI
CPA3G1-A   gcgccatcgatgGAGAGCAGGGTCTCCTGGGTAGG
           EcoRI的5′端Sγ1下游51bp的MUSIGHANB核苷酸的8893～8915位
```

鼠尼古丁乙酰胆碱受体基因(*nAchR*,参见该对照描述的注解)

```
                 SalI
nAChR-B    ggccggtcgacAGGCGCGCACTGACACCACTAAG
           MUSACHRBB核苷酸的5994～5972位

                 ClaI
nAChR-A    gcgccatcgatGGACTGCTGTGGGTTTCACCCAG
           MUSACHRBB核苷酸的9545～9567位
```

图 14.4.2　寡核苷酸引物。大写字母为基因组 DNA 序列衍生的核苷酸，小写字母为外加的核苷酸，目的是提供酶切位点。5′Sμ 和 3′Sε 寡核苷酸为研究人 μ-ε 转换的 PCR 引物。316bp 5′Sμ 探针用于杂交 μ-ε 转换模板的 PCR 扩增产物。CPA5M-B 和 CAP3G1-A 用于 PCR 检测小鼠 Sμ-Sγ1 转换。nAChR-B 和 nAChR-A 引物用于扩增尼古丁乙酰胆碱受体的 DCPCR 产物（作为 DCPCR 反应重基因组 DNA 消化和环化对照）。所有的引物根据 GenBank 中的 DNA 序列设计。

然后再冰浴 30min；其中每隔 5min 就用振荡器轻柔振荡使细胞和磁珠均匀悬浮于 PBS 中。

4. 将离心管置于两块钴磁石间 2min，弃去 FCS/PBS，分离 B 细胞。重悬细胞，磁石分选，至少重复 3 次以上。
5. 最后一次 FCS/PBS 洗细胞后，5ml PBS 悬浮细胞和吸附的磁珠，1000g 离心 5min。
6. 弃上清，用 1.58ml 10mmol/L Tris · Cl（pH8.0）/10mmol/L EDTA 重悬细胞，将

悬液置于 15ml 圆底离心管中。并加入 200μl 10%SDS［终浓度 1%（m/V）］和 200μl 3mol/L pH5.0 乙酸钠轻轻地混匀，使细胞充分裂解。然后将样品冻存于 −20℃中直至所有的样品都处理好。

7. 融化冻存的样品，加入 20μl 10mg/ml 的蛋白酶 K，37℃中孵育 5h 消化样品中的蛋白质。
8. 2ml 苯酚缓冲液提取 DNA 一次，室温，1200g 离心 5min；将水相移入新的 15ml 离心管中，2ml 25∶1 的氯仿/异戊醇抽提，再次室温，1200g 离心 5min；随后又将水相移入新的 15ml 离心管中，加入 5ml 95%的乙醇。颠倒混匀，室温放置 10min 使 DNA 沉淀。
9. 室温，1200g 离心 10min，弃上清，用 70%的乙醇重悬；再离心 5min，弃上清，用 70%的乙醇重复洗一遍，在空气中风干沉淀。
10. 加入 50μl 的 TE 缓冲液，4℃孵育过夜溶解 DNA。取 2μl 样品用荧光比色法测定 DNA 的浓度。

    5×10^7 个细胞一般能得到 5～20μg DNA。
11. 在 0.5ml 的微量离心管中加入扩增所需物质（总体积 25μl），用滤网枪头转移溶液：

    0.5μl 的淋巴细胞 DNA

    各 1.0μl 2.5μmol/L 的上下游寡核苷酸引物（终浓度为 0.1μmol/L）

    2.5μl 10×PCR 扩增缓冲液

    无菌水补到 25μl。

    表面覆盖一滴矿物油（约 50μl）。
12. 将离心管置于 PCR 仪上 95℃反应 1min，然后冷却到 80℃，再在各管中加入 1μl（2.5U）*Taq* DNA 聚合酶。
13. 根据以下程序在 PCR 仪中进行反应：

2 个循环：	1min	95℃	变性
	1.5min	58℃	复性
	6min	72℃	延伸
40 个循环：	1min	95℃	变性
	1.5min	63℃	复性
	6min	72℃	延伸

14. 取 8μl 的 PCR 产物进行琼脂糖电泳（琼脂糖浓度为 0.7%，TBE 电泳缓冲液）。
15. 通过毛细管印迹法将胶上的 DNA 转移到 Immobilon-N 膜上。

    也可以用嵌套式引物再次扩增，最后产物琼脂糖电泳。
16. 置小心预湿的 Immobilon-N 膜和 10ml 预杂交溶液（每 150cm^2 膜）在密封塑料袋中，65℃预杂交 5～24h。
17. 塑料袋开一小口，加入 ^{32}P 标记的变性探针，再次密封塑料袋，彻底混匀，然后在 65℃振荡的水浴中杂交 8～16h。
18. 分别用以下液体洗膜 3 次：

    室温　2×SSC/1%SDS/10mmol/L EDTA 振荡 5min

    室温　2×SSC/1%SDS/10mmol/L EDTA 振荡 15min

    65℃　0.1×SSC/1%SDS/10mmol/L EDTA 振荡 15min。

19. 用增感屏在－80℃放射显影5h。如果需要可延长显影时间重新曝光。

辅助方案　通过PCR和随机引物标记法制备5′Sμ探针

材料（带√项目见附录1）

pXE质粒（Mills *et al*.，1990；可从作者处获得）或人类基因组DNA

2.5μmol/L寡核苷酸引物NPS-AR和F14（图14.4.2A；无菌水配成2.5pmol/μl，－20℃保存）

√10×直接PCR扩增缓冲液

2.5U *Taq* DNA聚合酶

矿物油

沸水浴

1. 在0.5ml微量离心管中，加入下列扩增混合物（总体积25μl）：

   10ng pXE质粒

   2.5μmol/L的NPS-AR和F14引物各1μl（终浓度为0.1μmol/L）

   2.5μl 10×直接PCR扩增缓冲液

   1μl（2.5U）*Taq* DNA聚合酶

   加水至总体积25μl

   在混合物上覆盖一滴矿物油（50μl）。

   人类基因组DNA需要更多DNA模板和扩增循环数。

2. 扩增程序：

40个循环：	1min	95℃
	1.5min	55℃
	3min	74℃

3. 在低熔点琼脂糖中纯化PCR扩增产物，并且通过琼脂糖电泳或荧光比色法检查纯度和产量。

4. 用随机寡核苷酸引物合成法同位素标记50～100ng扩增片段。3min沸水浴使探针变性。

   探针长度为316bp，位于5′Sμ引物和Sμ pentameric重复区之间。

基本方案2　消化-环化PCR

限制酶消化小鼠B淋巴细胞的基因组DNA，所切的基因片段位点包含环化和扩增的目的转换区（图14.4.3）。为了从PCR产物得到起始重组基因的模板数量，以下两个对照是必需的：一个是消化和环化效率对照，另一个是PCR各管之间的效率差异对照。

材料（带√项目见附录1）

小鼠脾脏（附录2H）

√RPMI-5完全培养基（其中含有1U/ml青霉素和1μg/ml链霉素）

4mg/ml大肠杆菌LPS

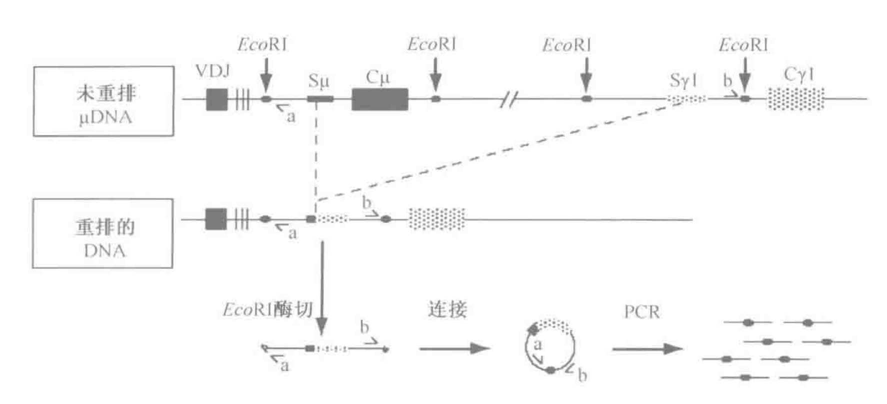


图 14.4.3　DCPCR 检测 Sμ-Sγ1 转化重组。顶排为 υ-ε 转换重组涉及的小鼠免疫球蛋白框架：装配好的 VDJ 区，两个恒定区（Cμ-Cγ1），两个转换区（Sμ-Sγ1），4 个 *Eco*RI 酶切位点。寡核苷酸 a 和寡核苷酸 b 的位置分别对应图 14.2.2 中 CPA5M-B 和 CAP3G1-A。转换再结合去掉了点线之间的 DNA 序列，形成了第二行中的结构（"转换 DNA"）。第三行描述了 DCPCR 的中间步骤：带有 Sμ-Sγ1 转换区的线性片段和 DCPCR 引物 a 和 b 扩增的靶序列；*Eco*RI 酶切后的连接片段的环化；引物 a 和 b 得到的 PCR 产物。

小鼠重组 IL-4（表 5.0.1），无菌

*Eco*RI 限制性内切核酸酶和 10×*Eco*RI 缓冲液

√400U/μl T4 DNA 连接酶和 10×连接酶缓冲液（附录 1）

√10×DCPCR 扩增缓冲液

2.5μmol/L 寡核苷酸引物（图 14.4.2B；溶于无菌水至 2.5pmol/μl，－20℃保存）

2.5U *Taq* DNA 聚合酶

无菌水

经过修饰的 spiking 质粒（可选，可由作者处获得）

10mCi/ml [α-^{32}P] 标记的 dCTP（3000Ci/mmol）

矿物油

37℃，6% CO_2 增湿箱

70℃和 16℃水浴

1.5ml 和 0.5ml 微量离心管，高压灭菌

滤网枪头（欧洲实验室）

PCR 仪

1. 从小鼠脾脏制备淋巴细胞悬液。用 T 细胞特异性表面抗原的抗体去除 T 细胞和补体（CPI 单元 3.4），通过不连续 Percoll 密度梯度离心法获得静息期的 B 细胞（单元 2.5），取 66%～70%片段。

   10 个脾脏产生 10^8 个细胞。

2. 在 RPMI-5 完全培养基中培养 B 细胞，初始浓度 1×10^5～2×10^5 个细胞/ml。加入 LPS（终浓度 20μg/ml）和 IL-4（终浓度 10 000U/ml）放置于培养箱中，并定期换液（如 2.5～4 天）。

加入 LPS 至终浓度之后需将培养基进行过滤除菌，经过过滤除菌后加入 IL-4。

3. 制备基因组 DNA，并通过荧光比色或紫外分光光度法在 280nm 和 260nm 处测定 DNA 浓度。TE 缓冲液调节浓度至 20μg/ml。
4. 1.5ml 微量离心管配制酶切反应体系：

   2μg 基因组 DNA（从步骤 3 开始）

   10μl 10×*Eco*RI 缓冲液

   5U *Eco*RI

   加水至 100μl。

   37℃孵育 6～8h 或者过夜，70℃孵育 20min 灭活限制酶活性。
5. 在另一 1.5ml 微量离心管中配制连接反应体系（终体积 100μl）：

   9μl *Eco*RI 消化混合物（步骤 4 的酶切产物；DNA 终浓度 1.8μg/ml）

   10μl 10×连接缓冲液（终浓度 1×）

   2μl T4 DNA 连接酶（终浓度 800U）

   79μl 水

   16℃孵育过夜。
6. 将 0.5ml 离心管放于冰上，配制扩增体系（共 20μl）：

   用滤网枪头转移溶液

   3μl 连接混合物（步骤 5 的连接产物；约 5ng DNA）

   2μl 10×DCPCR 扩增缓冲液

   2.5pmol/μl 寡核苷酸引物各 4μl（终浓度 0.5μmol/L）

   1μl 2.5U/μl *Taq* DNA 聚合酶（终浓度 2.5U）

   6μl 水

   表面覆盖一滴矿物油（约 50μl）。

   如果要定量 PCR 反应，在扩增体系中加入下列试剂：① 1μl 修饰过的 spiking 质粒，稀释到 10～2000 个分子/μl；② 10mCi/ml [α-^{32}P] 标记的 dCTP 0.5μl（特异活性 3000Ci/mmol）。
7. 扩增步骤

1 个循环：	6min	94℃	预变性
5 个循环：	1min	94℃	变性
	1min	65℃	复性
	2min	72℃	延伸
30 个循环：	1min	94℃	变性
	1min	68℃	复性
	2min	72℃	延伸
1 个循环：	7min	72℃	延伸

8. 用非变性聚丙烯酰胺电泳法分析 PCR 扩增产物。

参考文献：Chu *et al.*，1992

撰 稿 人：Edward E. Max，Frederick C. Mills，and Charles Chu

单元 14.5　PCR 检测细胞因子 mRNA 的表达

基本方案　定量 IL-2 mRNA 表达水平

材料（带√项目见附录 1）

内参照：转录质粒载体（含有临床生物检测标本相关的 cDNA）
√胍盐溶液
50 U/μl RNasin
√5×反转录酶缓冲液
0.5mg/ml olig（dT)$_{16}$
1mg/ml 乙酰化的 BSA
√4dNTP 混合液
200U/μl Mo-MuLV 反转录酶
√10×无 $MgCl_2$ PCR 扩增缓冲液
扩增引物：20μmol/L 5′端和 3′端目的细胞因子特异性引物（表 14.5.1 和表 14.5.2）
5U/μl *Taq* DNA 聚合酶
矿物油
含有 1μg/ml 溴化乙锭的 3%琼脂糖胶（*m*/*V*）（附录 1）
DNA marker
13mm×100mm 组织研磨器
1.5ml 和 0.5ml 离心管，高压灭菌
65℃和 39℃水浴
注意：当处理人血细胞或者传染物时，必须按照生物安全程序（前言）进行。

表 14.5.1　人细胞因子 cDNA PCR 扩增引物

细胞因子	引物位置	序列(5′→3′)	扩增片段大小/bp
IL-1α[a]	5′	GTAAGCTATGGCCCACTCCAT	408
	3′	TGACTTATAAGCACCCATGTC	
IL-1β[a]	5′	GACCTGGACCTCTGCCCTCTG	408
	3′	AGGTATTTTGTCATTACTTTC	
IL-2[a]	5′	AACTCCTGTCTTGCATTGCA	441
	3′	GTGTTGAGATGATGCTTTGAC	
IL-3[a]	5′	GCCTTTGCTGGACTTCAACA	194
	3′	TTGGATGTCGCGTGGGTGCG	
IL-4[a]	5′	CAACTTTGTCCACGGACAC	345
	3′	TCCAACGTACTCTGGTTGG	
IL-5[a]	5′	AGGATGCTTCTGCATTTGAG	394
	3′	CTATTATCCACTCGGTGTTC	

续表

细胞因子	引物位置	序列(5′→3′)	扩增片段大小/bp
IL-6[b]	5′	AACTCCTTCTCCACAAGCG	610
	3′	TGGACTGCAGGAACTCCTT	
IL-7[b]	5′	ATGTTCCATGTTTCTTTTAGG	707
	3′	AGCTTTTCTTTAGTGCCCATCAAAATTTTATTCCAACA	
IL-8[c]	5′	ATTTCTGCAGCTCTGTGTGAA	255
	3′	TGAATTCTCAGCCCTCTTCAA	
IL-13[d]	5′	TCACCCAGAACCAGAAGGCTCCG	280
IFN-γ[b]	5′	ATGAAATATACAAGTTATATC	501
	3′	TTACTGGGATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCAT	
TNF-α[b]	5′	ATGAGCACTGAAAGCATGATC	702
	3′	TCACAGGGCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCC	
TGF-β[b]	5′	AACATGATCGTGCGCTCCTGCAAGTGCAGC	
	3′	AAGGAATAGTGCAGACAGGCAGGA	200
GM-CSF[a]	5′	CTGCTGAGATGAATGAAACAG	165
	3′	AGTGCTGCTTGTAGTGGCT	
G-CSF[a]	5′	ACAGTGCACTCTGGACAGT	364
	3′	TCCAGCTGCAGTGTGTCCA	
M-CSF[a]	5′	TGCTGAATGCTCCAGCCAA	170(α)
α/β/γ			1064(β)
	3′	TCTGAGGCTCTTGATGGCT	716(γ)
β-actin[c]	5′	TCCTGTGGCATCCACGAAACT	314
	3′	GAAGCATTTGCGGTGGACGAT	

a. 引自 Sorg 等（1991）。

b. 引自 Brenner 等（1989）。

c. 引自 Carré 等（1991）。

d. 用来鉴定 PCR 产物的真实性内部序列为 GCATCGAGAAGACCCAGAGG，引自 McKenzie 等（1993）。

表 14.5.2　小鼠细胞因子 cDNA PCR 扩增引物

细胞因子	引物位置	序列
IL-1α[b]	5′	TTACAGTGAAAACGAAGA
	3′	TGTTTGTCCACATCCTG
	I	GAGAACCTCTGAAACGTC
IL-1β[b]	5′	GCAACTGTTCCTGAACTCA
	3′	CTCGGAGCCTGTAGTGCAG
	I	ATTGTGGCTGTGGAGAA
IL-2[b]	5′	AACAGCGCACCCACTTCAA
	3′	TTGAGATGATGCTTTGACA
	I	GTTCATCTTCTAGGCACTG
IL-3[b]	5′	GCCAGCTCTACCACCAGCA
	3′	AACATTCCACGGTTCCACG
	I	AGGTTCTGGGAGCTTCCC

续表

细胞因子	引物位置	序列
IL-4[b]	5′	TAGTTGTCATCCTGCTCTT
	3′	CTACGAGTAATCCATTTGC
	I	GATGATCTCTCTCAAGTG
IL-5[b]	5′	AAGGATGCTTCTGCACTTGA
	3′	ACACCAAGGAACTCTTGCA
	I	TCCGTCTCTCCTCGCCAC
IL-6[b]	5′	TTCCTCTCTGCAAGAGACT
	3′	TGTATCTCTCTGAAGGACT
	I	CATTTCCACGATTTCCCA
IL-7[b]	5′	ACATCATCTGAGTGCCACA
	3′	CTCTCAGTAGTCTCTTTAG
	I	TGCCTTGTGATACTGTTAG
IL-13[c]	5′	ATGGCGCTCTGGGTGACTGCAG
	3′	GAAGGGGCCGTGGCGAAACAGTTG
	I	GCCCCCACTACGGTCTCCAGCCTC
LT[d]	5′	TCAGAAGCACTTGACCCAT
	3′	AAGTCCCGGATACACAGACT
	I	CAAAGTAGAGGCCACTGG
IFNγ	5′	AACGCTACACACTGCATCT
	3′	TGCTCATTGTAATGCTTGG
	I	TCGCCTTGCTGTTGCTGT
GM-CSF	5′	TTCCTGGGCATTGTGGTCT
	3′	TGGATTCAGAGCTGGCCTGG
	I	ACCTCTTCATTCAACGTG
IL-2Rβ[e]	5′	CCAGCTGCTTCACCAACCA
	3′	AGAAGAGCAGCAGGTCATC
	I	CCTGCCAGGTGTACTT
β-actin[f]	5′	ATGGATGACGATATCGCT
	3′	ATGAGGTAGTCTGTCAGGT
	I	AGCAAGAGAGGTATCCT

a. I 为用来鉴定 PCR 产物正确性的内部序列。

b. 引自 Montgomery 和 Dallman 等（1991）。

c. 引自 McKenzie 等（1993）。

d. LT：淋巴毒素，也叫做 TNF-β。

e. IL-2Rβ 序列为人和大鼠 cDNA 序列相同区域及小鼠氨基酸序列衍生而来（Montgomery and Dallman，1991）。

f. β-actin 序列用来检测 RNA 的表达。

1. 准备内参照：利用克隆两侧的 SP6、T3 或 T7 聚合酶位点，获得或亚克隆目的细胞因子 cDNA 到转录质粒。
2. 体外转录从质粒中获得正义 RNA。DEPC 水悬浮 RNA（终浓度 1μg/μl）。

   可以使用商业化的体外转录测试试剂盒（如 Promega）。
3. 获得 4 个生物检测（共约 $100mm^3$）样本，并立刻干冰冷冻。随后用 13mm×100mm

组织研磨器在1ml胍盐溶液中碾匀组织。通过异硫氰酸胍法提取总RNA，无菌水配成1μg/μl的浓度。

4. 取4个不同浓度的IL-2 RNA（来自步骤2）作为对照（10pg、1pg、0.1pg、0.01pg），各放入1.5ml离心管中。每管中加入5μg待测总RNA样本（来自步骤3），如果需要用水调整体积到12.5μl/管，另一管加入12.5μl水作为阴性对照。65℃水浴中孵育5min变性，随后冷却到室温。
5. 每管加入下列物质：

   1μl（50U）RNasin
   6μl 5×反转录缓冲液
   3μl oligo（dT)$_{16}$
   3μl 乙酰化的BSA
   1.5μl 4dNTP混合液
   1.5μl 水。

   最后加入1.5μl（300U）Mo-MuLV反转录酶，39℃孵育1h，65℃，10min终止反应。
6. 取各样品5μl到0.5ml离心管中，并在每管中加入下列试剂混合：

   5μl 10×去$MgCl_2$ PCR扩增缓冲液
   4μl 4dNTP混合液
   2.5μl各扩增引物（各自终浓度20μmol/L）
   30.75μl水
   1.25U *Taq* DNA聚合酶
   1滴矿物油。
7. PCR反应

   30个循环：45s 94℃ 变性
   60s 60℃ 复性
   90s 72℃ 延伸
   1个循环： 7min 72℃ 延伸。
8. 取各样品20μl在3%包含1μg/ml溴化乙锭的琼脂糖凝胶上电泳。
9. 电泳后，在水中轻柔洗胶30min以降低背景。在紫外透照仪下观察结果。通过确定等强度的待测样品和标准条带估计IL-2 RNA的浓度。

参考文献：Mullin *et al*.，1992

撰 稿 人：Stephen P. James

单元14.6 PCR检测人T细胞受体基因的表达

基本方案 PCR检测人T细胞受体基因的表达

PCR能够检测特定抗原刺激和疾病时人T细胞受体可变基因家族的表达情况（图

14.6.1)。

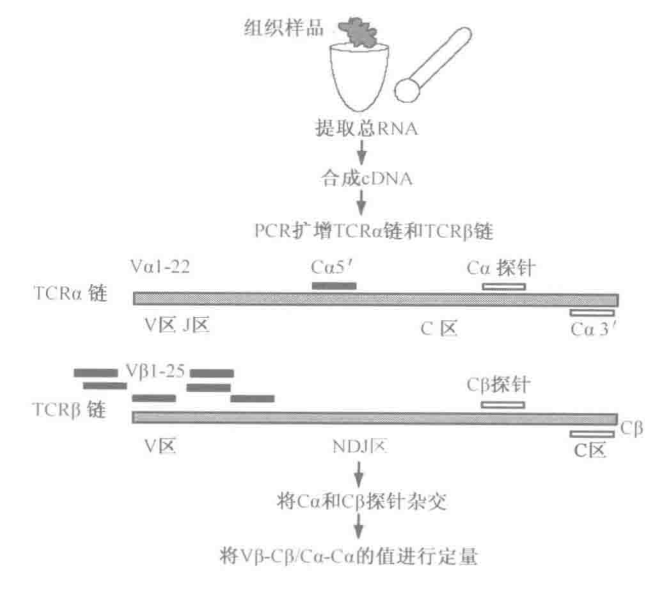


图 14.6.1　PCR 检测 TCR 表达。

材料（带√项目见附录 1）

50μmol/L 的 TCR 引物（表 14.6.1，－20℃保存）

无菌水

√10×无 $MgCl_2$ 的 PCR 扩增缓冲液和 15mmol/L $MgCl_2$

0.01μg/μl cDNA（见辅助方案 2）

2.5U/μl *Taq* DNA 聚合酶

矿物油

用 1×TBE 电泳缓冲液配制 1.5%（*m/V*）Nusieve GTG 琼脂糖/ 0.5%琼脂糖

变性溶液：0.5mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl（室温保存）

中和溶液：0.5mol/L Tris · Cl（pH7.0）/1.5mol/L NaCl（室温保存）

√20×SSPE

1%（*m/V*）SDS

杂交溶液

辣根过氧化物酶标记的寡核苷酸探针

1×SSPE/1%（*m/V*）SDS

0.1×SSPE/1%（*m/V*）SDS

√PBS

增强化学发光（ECL）基因检测系统

无菌的 0.5ml 聚碳酸盐离心管

无菌的 1.5ml 离心管

PCR 仪

尼龙膜

紫外交联仪

热密封杂交袋

X 射线胶片

注意：在处理人血或人的组织样本时，必须按照生物安全程序（前言）执行。

表 14.6.1 T 细胞受体扩增引物[a]

α引物	序列	β引物	序列
Vα1	5′-TTGCCCTGAGAGATGCCAGAG-3′	Vβ1	5′-GCACAACAGTTCCCTGACTTGCAC-3′
Vα2	5′-GTGTTCCAGAGGGAGCCATTGCC-3′	Vβ2	5′-TCATCAACCATGCAAGCCTGACCT-3′
Vα3	5′-GGTGAACAGTCAACAGGGAGA-3′	Vβ3	5′-GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC-3′
Vα4	5′-ACAAGCATTACTGTACTCCTA-3′	Vβ4	5′-ACGATCCAGTGTCAAGTCGAT-3′
Vα5	5′-GGCCCTGAACATTCAGGA-3′	Vβ5.1	5′-ATACTTCAGTGAGACACAGAGA-3′
Vα6	5′-GTCACTTTCTAGCCTGCTGA-3′	Vβ5.2	5′-TTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG-3′
Vα7	5′-AGGAGCCATTGTCCAGATAAA-3′	Vβ6	5′-AGGCCTGAGGGATCCGTCTC-3′
Vα8	5′-GGAGAGAATGTGGAGCAGCATC-3′	Vβ7	5′-CCTGAATGCCCCAACAGCTCTC-3′
Vα9	5′-ATCTCAGTGCTTGTGATAATA-3′	Vβ8	5′-ACTTTAACAACAACGTTCCGA-3′
Vα10	5′-ACCCAGCTGCTGGAGCAGAGCCCT-3′	Vβ9	5′-CTAAATCTCCAGACAAAGCTCAC-3′
Vα11	5′-AGAAAGCAAGGACCAAGTGTT-3′	Vβ10	5′-TCCAAAAACTCATCCTGTACCT-3′
Vα12	5′-CAGAAGGTAACTCAAGCGCAGACT-3′	Vβ11	5′-TGTTCTCAAACCATGGGCCATGAC-3′
Vα13	5′-GCTTATGAGAACACTGCGT-3′	Vβ12	5′-GATACTGACAAAGGAGAAGTCTCAGAT -3′
Vα14	5′-GCAGCTTCCCTTCCAGCAAT-3′	Vβ13	5′-GGTGAGGGTACAACTGCC-3′
Vα15	5′-AGAACCTGACTGCCCAGGAA-3′	Vβ14	5′-ACCCAAGATACCTCATCACAG-3′
Vα16	5′-CATCTCCATGGACTCATATGA-3′	Vβ15	5′-AGTGTCTCTCGACAGGCACAG-3′
Vα17	5′-GACTATACTAACAGCATGT-3′	Vβ16	5′-CATGATAATCTTTATCGACGTGTT-3′
Vα18	5′-TGTCAGGCAATGACAAGG-3′	Vβ17	5′-TTTCAGAAAGGAGATATAGCT-3′
Vα19	5′-CTCGGTAGGAATAAGTGC-3′	Vβ18	5′-AGCCCAATGAAAGGACACAGTCAT-3′
Vα20	5′-CATGGACTCATATGAAGGACA-3′	Vβ19	5′-ACCCCCGAAAAAGGACATACT-3′
Vα21	5′-GACTATACTAACAGCATGT-3′	Vβ20	5′-CTCTGAGGTGCCCCAGAA-3′
Vα22	5′-TGTCAGGCAATGACAAGG-3′	Vβ21	5′-CCTATTTCTGGCCATGCTACCCTT-3′
		Vβ22	5′-GATCAGAGAAAAGAGGGAAAC-3′
		Vβ23	5′-ATGAAATCTCAGAGAAGTCT-3′
		Vβ24	5′-TACCCAGTTTGGAAAGC-3′
Cα	5′-AATAGGTCGACAGACTTGTCACTGGA -3′	Cβ	5′-TTCTGATGGCTCAAACAC-3′
Cα 探针	5′-GTGTACCAGCTGAGAGACTCTA-3′	Cβ 探针	5′-TTCCCACCCGAGGTCGCTGT-3′
Cβ5′	5′-GAGGACCTGAAC/(A)AAG/(C)GTG-3′	Cβ5′	5′-ATCCAGAACCCTGACCCTGCC-3′
Cβ3′	5′-CATTCACCCACCAGCTCAGCT-3′	Cα3′	5′-ATCATAAATTCGGGTAGGATCC-3′
Actin 5′	5′-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3′	Actin 3′	5′-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3′

a. 引自 Oksenberg 等(1990)，Oksenberg 等(1993)，Bragado 等(1990)，Choi 等(1989)，Wucherpfennig 等(1990)。

1. 用无菌水将 50μmol/L 的 Vα 和 Vβ 寡核苷酸引物稀释到 5μmol/L 的浓度。取 5μl 稀释的 TCR V 引物加入到 0.5ml 无菌聚碳酸盐离心管。
2. 准备 2 个 1.5ml 无菌离心管，一管放置 α 家族的反应体系，另一管放置 β 家族的反应体系。分别在 2 管中加入以下的反应物（45μl/次反应）。配制时应当比待测样本数多配制 1 或 2 份以防止使用移液器时的损失。

   4μl 10×扩增缓冲液
   10μl cDNA（0.1μg）
   0.5μl 50μmol/L Cα 或 Cβ3′寡核苷酸引物
   0.5μl 2.5U/μl *Taq* DNA 聚合酶
   30μl 无菌水。

   振荡，瞬时离心，分装前置于冰上。
3. 将 45μl 反应液加入到分别含有 5μl Vα 和 Vβ5′寡核苷酸引物的离心管中。轻轻振荡，在室温下以最大速度离心，加一滴矿物油以防蒸发。
4. 用下例参数扩增样本：

   1min　93℃　变性
   1min　55℃　复性
   1min　72℃　延伸。

   对于来自外周血白细胞的 cDNA，进行 25 个循环扩增 TCR 转录产物；对于有少许淋巴细胞浸润的组织 cDNA，扩增 35 个循环。
5. 将油下层的扩增产物移到一个新的微量离心管中，取 1～3μl PCR 产物进行电泳（产物于 1.5%（*m/V*）的 Nusieve GTG 琼脂糖/ 0.5%（*m/V*）琼脂糖电泳）；分别跑两块胶分析 α、β 产物；溴化乙锭染色胶体，然后照相。
6. 在变性溶液中浸泡凝胶 30min，然后在中性溶液中浸泡 30min。
7. 通过 Southern 印迹将 DNA 印迹在浸泡于 20×SSPE（见 CPI 单元 10.6A）的尼龙膜上，紫外交联剂固定膜；在 1%SDS 中煮沸 3min。将膜置于杂交袋中，随后放于 42℃杂交溶液预杂交渗透 15min。每毫升杂交溶液加入 1pmol 辣根过氧化物酶标记的 Cα 和 Cβ 寡核苷酸探针。42℃杂交 1h；然后室温下用 1×SSPE/1%SDS 洗膜 15min，0.1×SSPE/1%SDS 洗膜 10min，PBS 洗膜 5min。
8. 加入底物（增强化学发光基因检测系统）孵育 1min，X 射线胶片曝光（最初曝光 5min，再调整时间）。

备选方案　PCR 定量检测 TCR 可变序列转录产物

材料（其他材料见基本方案）

50μmol/L TCR Cβ3′，Cα5′和 Cα3′引物（表 14.6.1）
光密度计

1. 每个 50μmol/L TCR Vβ 5′引物用无菌水稀释到 3μmol/L 。无菌的薄壁 0.5ml 的聚碳酸盐 PCR 管子加入 5μl 稀释后的引物。
2. 按下面的配方根据样品数在 1.5ml 微离心管中配制反应原液（40μl/反应管）。多配 1

或 2 份防止加样时有损失。

4μl 10×扩增缓冲液
10μl cDNA（0.1μg）
0.3μl 50μmol/L Cβ3′引物
0.3μl 50μmol/L Cα5′引物
0.3μl 50μmol/L Cα3′引物
25.1μl 无菌水。

振荡，瞬时离心，放于冰上。在每个反应管加入 40μl 原液，用最大速度短暂离心。

3. 同上在无菌 1.5ml 离心管准备热启动溶液（5μl/反应管）：

4.5μl 2.5mmol/L 4dNTP
0.5μl 2.5U/μl *Taq* DNA 聚合酶。

振荡，离心到管底。放置于冰上。

4. 转移样品到 PCR 仪上预热到 80℃。迅速（8min 内）加入 5μl 热启动溶液。并用移液器上下吹动使得充分混匀。加入一滴矿物油避免样品蒸发。
5. 扩增参数如下：

1min 93℃ 变性
1min 55℃ 复性
1min 72℃ 延伸。

外周淋巴细胞为 15 个循环，组织为 20～25 个循环。定量分析需要检测对数扩增期的产物，必须调整循环数。

6. 取 10～15μl PCR 产物跑 1.5%（*m/V*）NuSieve GTG 琼脂糖/0.5%（*m/V*）琼脂糖胶。溴化乙锭染色，UV 紫外透照仪下观察结果，确认没有条带。
7. 印迹、交联和预杂交薄膜见基本方案步骤 7。在杂交液中加入 1pmol/ml HRP 偶联的 Cα 和 Cβ 寡核苷酸探针。42℃ 孵育 1h。薄膜先用 1×SSPE/1%SDS 洗 15min，然后 0.1×SSPE/1%SDS 洗 10min。最后 PBS 洗 5min。室温进行。
8. 薄膜在增强化学发光基因检测系统显影 1min。室温下 X 射线胶片曝光 1min、10min、30min 或者过夜。显像密度仪定量不同曝光时间的杂交产物强度。

曝光过夜，检测有无非特异性条带。

9. 用每个 Vβ 家族曝光三次的数据作图，确定定量分析的最佳曝光时间。在实验中选择处于指数期的曝光时间。定量表达 TCR Vβ 转录物作为共扩增 Cα 转录物相对百分比标准。

辅助方案 1 重排 V-D-J 区测序

特定 TCR 家族的 PCR 产物进行测序，检测扩增转录物的 V-D-J 重排情况（图 14.6.2）。

附加材料（其他材料见基本方案，带√项目见附录 1）

CloneAmp 克隆系统（GIBCO/BRI）包含：
pAMP1 质粒

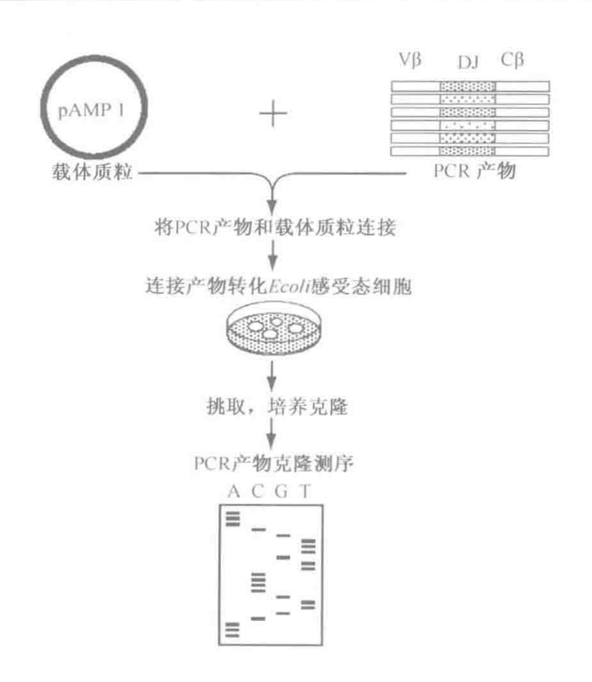


图 14.6.2　鉴定 T 细胞受体 PCR 产物的 V-D-J 重排。

25ng/μl 1U/μl 尿嘧啶-DNA 糖基化酶

10×PCR 缓冲液

DH5α 感受态细菌

50μmol/L TCR 上游引物（V 引物）带 5′端接头 5′-CUACUACUACUA-3′

50μmol/L TCR 下游引物（C 引物）带 5′端接头 5′-CUACUACUACUA-3′

√LB 培养平板含 50μg/ml 氨苄青霉素

√TB 培养基

0.7%（*m/V*）琼脂糖凝胶

测序酶 2.0 版 T7 DNA 聚合酶试剂盒：

5×复性缓冲液：200mmol/L Tris · Cl（pH7.5）/100mmol/L $MgCl_2$/250mmol/L NaCl

0.1mol/L 二硫苏糖醇（DTT）

标记的核苷酸混合液：dGTP、dCTP 和 dTTP 的浓度均为 1.5mmol/L

√终止核苷酸混合液

√终止液：

酶稀释缓冲液：10mmol/L Tris · Cl（pH7.5）/ 5mmol/L DTT/0.05%（*m/V*）

BSA，200U 或者是 1000U 测序酶 2.0 版 T7 DNA 聚合酶

Centricon-100 离心过滤器和尖头帽（Perkin-Elmer Vetus）

Backman J2-21M 离心机和 JA-20 转子

37℃细菌培养箱，具有摇动功能

1. 准备 PCR 反应液（100μl 反应体系），扩增感兴趣的 TCR 家族。

8μl 10×PCR 缓冲液

20μl cDNA（0.2μg 稀释于 PRC 扩增缓冲液）
1μl 50μmol/L 5′端带接头的 TCR 上游引物（V 引物）
1μl 50μmol/L 5′端带接头的 TCR 下游引物（C 引物）
1μl 2.5U/μl *Taq* DNA 聚合酶
69μl 无菌水。

振荡混合，瞬时离心，使得液体沉于管底。加入一滴矿物油。

2. 扩增参数：

35 个循环：	1min	93℃	变性
	1min	55℃	复性
	1min	72℃	延伸。

3. 转移 PCR 产物到干净的管子，并转移到 Centricon-100 微型离心凝胶过滤柱。加入 2ml 无菌水，4℃，5000r/min 离心 15min。再加入 2ml 无菌水，4℃，5000r/min 离心 15min。弃去离心下来的液体。盖上尖头帽。颠倒柱子，4℃，3000r/min 离心 5min。转移尖头帽里纯化的 PCR 产物到无菌的 1.5ml 微离心管。如果纯化产物>50μl，用 Speedvac 脱水器浓缩反应产物。
4. 克隆前，琼脂糖电泳和 Southern 印迹检测 1～2μl PCR 纯化产物确保是 TCR 家族转录产物。
5. 利用 CloneAmp 克隆体系克隆 TCR 转录产物。连接 50ng PCR 产物和 50ng pAMP1 载体。30ng 连接产物转化 DH5α。转化的细菌涂于含 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 平板。37℃培养箱过夜。

　　通过在溴化乙锭染色的凝胶上和已知浓度的 marker 比较条带亮度来对 PCR 产物进行定量。

6. 挑取单个克隆到 2ml LB 培养基中，37℃持续振荡摇动过夜。碱裂解法（CPI 单元 10.3）提取质粒 DNA。在 0.7%（*m*/*V*）的琼脂糖电泳及同 Cα 或者 Cβ 探针杂交，用增强化学发光试剂检测是否插入。
7. 测序酶 2.0 版 T7 DNA 聚合酶试剂盒对阳性克隆测序。

辅助方案 2　cDNA 合成

材料（带√项目见附录 1）

新鲜或冻存的组织或者是外周血淋巴细胞
√10×不含 $MgCl_2$ 的 PCR 缓冲液，15mmol/L $MgCl_2$
√2.5mmol/L 4dNTP 混合液
50 A_{260} U 6 碱基随机引物序列（Pharmacia Biotech），重悬在 1ml DEPC 水中
10U/μl 人源胎盘 RNase 抑制剂（GIBCO/BRL）
200U/μl SuperScript MuLVH 反转录酶（GIBCO/BRL）
√DEPC 处理过的无菌水

1. 胍盐法提取 50mg（湿重）新鲜分离或冻存的组织样本，或者 5×10^6 外周血淋巴细胞（CPI 单元 10.11）。

RNAzol B 法（Tel-Test）也能得到 RNA。

假如组织很难捣匀（如骨骼肌），放到灭菌的无 RNase 的研钵，在液氮冻存。等到大部分液体蒸发，杵捣用力碾磨成粉末，要避免组织解冻。转移粉末到灭菌的无 RNase 的匀浆器中，置于冰上，加入胍溶液提取 RNA。

2. 在无菌的 1.5ml 离心管中加入下列试剂：

   5μg 总 RNA

   50μl 10×扩增缓冲液

   50μl 2.5mmol/L 的 4dNTP 混合液

   6.7U 6 碱基随机引物序列

   250U 人源胎盘 RNase 抑制剂

   5000U Superscript MuLVH 反转录酶

   无菌 DEPC 水补至 500μl。

   振荡混匀，瞬时离心

3. 室温孵育 10min，37℃ 孵育 60min，然后 95℃，5min。迅速放于冰上冷却。－20℃保存。

   此方案根据 E. S. Kawasaki（1990）改编，5μg 总 RNA 合成 500μl cDNA，足够完成表 14.6.1 中所列引物来鉴定 TCRα 和 β 家族的研究实验。

   检验 cDNA 反应是否成功，可通过测量 A_{260} 或者在溴化乙锭染色的琼脂糖胶上出现一片模糊条带来确认。

撰 稿 人：Emonuela Gussoni，Michael A. Panzara，and Lawrence Steinman

单元 14.7　PCR 检测小鼠 T 细胞受体表达

基本方案 1　PCR 分析小鼠 TCR 基因表达

有两种方法扩增和克隆 TCRβ 或者 TCRα 靶基因（图 14.7.1）。首先，可用特异性的 5′Vβ 或者 Vα 和 3′Cβ 通用引物（$C\beta_{uni}$）或者 Cα 引物（表 14.7.1）扩增 TCR cDNA。可以用商业软件比如 Oligo 设计其他的 Vβ 或者 Vα 引物。另外，5′兼并引物 Vβ（$V\beta^c$）或者 Vα（$V\alpha^c$）和正确的 3′区引物也能得到 TCR 转录产物。

表 14.7.1　T 细胞受体扩增引物[a]

引物	序列
β 引物	
Vβ1	5′-TAA GCG GCC GCG GCA TCA TTA CTC AGA CAAC-3′
Vβ2	5′-GAC TTT GCT GGA GCA AAA CC-3′
Vβ3	5′-AAG ATA TCT GGT GAA AGG GC-3′
Vβ4	5′-TAT CTG GTG GCA GTC ACA GG-3′

续表

引物	序列
β 引物	
Vβ5	5′-GCA GCC CCA ACA AAT GCT G-3′
Vβ6	5′-GGC ATC ATT ACT CAG ACA CC-3′
Vβ7	5′-TAA GCG GCC GCG ACA TGA AAC TAA CCC AG-3′
Vβ8	5′-TAA GCG GCC GCG AGG CTG CAG TCA CCC AAA-3′
Vβ8. 2	5′-GTC ATC GAT TAT TTA CAT CTT-3′
Vβ9	5′-TTC TGT CTT CTT GCA GCC AC-3′
Vβ10	5′-CGG CTG TTT TCC AGA CTC CA-3′
Vβ11	5′-GCT GGT GTC ATC CAA ACA CC-3′
Vβ12	5′-CTT ATG GAA AGA TGG TGG GC-3′
Vβ13	5′-TTC CTC TAT AAC AGTTGC CC-3′
Vβ14	5′-CTG GAG CTC GAA TTC GCT CAG-3′
Vβ15	5′-GGA GCA CTC GTC TAT CAA TA-3′
Vβ16	5′-CCC AAA GTC TTA CAG ATC CC-3′
Vβ17a	5′-GAG TAA CCC AGA CTC CAC GA-3′
Vβ18	5′-GGA GCC AAG TTC CAG GAA CA-3′
$V\beta^{Cb}$	5′-TAA GCG GCC GCA TGS LYT GGT AYW XXC AG-3′
$C\beta_{uni}{}^{c}$	5′-CCA CGT GGA GCT GAG CTG-3′
5′Cβ	5′-GCT GAC CTG GTG GGT GAA TG-3′
$3'C\beta_{Rev}$	5′-ATA GAG GAT GGT GGC AGA CAA-3′
α 引物	
Vα1	5′-CAG CAG AAG GTG CAG CAG CAG-3′
Vα4	5′-CGC GCC TTC ACC ATC AAC CTT TGT CCT GAA CTG-3′
$V\alpha^{Cd}$	5′-TAA GCG GCC GCT GGT ACZ LMC AGC ATC CXG GMG AAG GCC-3′
Cα	5′-TCA ACT GGA CCA CAG CCT CAG-3′
5′Cα4	5′-GCA CAT TGA TTT CCC ACT CA-3′
$3'C\alpha5_{Rev}$	5′-CAC AAC CCA GAA CCT GCT GTG-3′
Actin 引物	
5′β-actin	5′-TGG GTC AGA AGG ACT CCT ATG-3′
3′β-actin	5′-CAG GCA GCT CAT AGC TCT TCT-3′

a. 信息引自 Danska 等（1990，1994），Galley 和 Danska（1995），Waters 等（1992）。

b. $V\beta^{C}$ 引物扩增 Vβ1，2，5，6，8，10，12，15，16。S，G/T；L，A/G/T；Y，C/T；W，A/C；X，A/G。

c. $C\beta_{uni}$复性到 $C\beta_1$ 和 $C\beta_2$ 的普遍性的保守区。Vβ1，7，8，$V\beta^{C}$ 和 $V\alpha^{C}$ 包含下画线部分的 *Not*I 限制位点以促进定向克隆。Vβ14 包含一个下画线部分的 *Sac*I 位点

d. $V\alpha^{C}$ 引物扩增 Vα1 至 9 和 Vα11 至 14。Z，40% A/40% G/15% C/5% T；L，A/G/T；M，45% A/50% G/5% C；X，C/T。

材料（带√项目见附录 1）

正常小鼠的组织匀浆或者是 HBSS 制备的单个细胞悬液（10^4～10^7）（附录 1）

无菌水

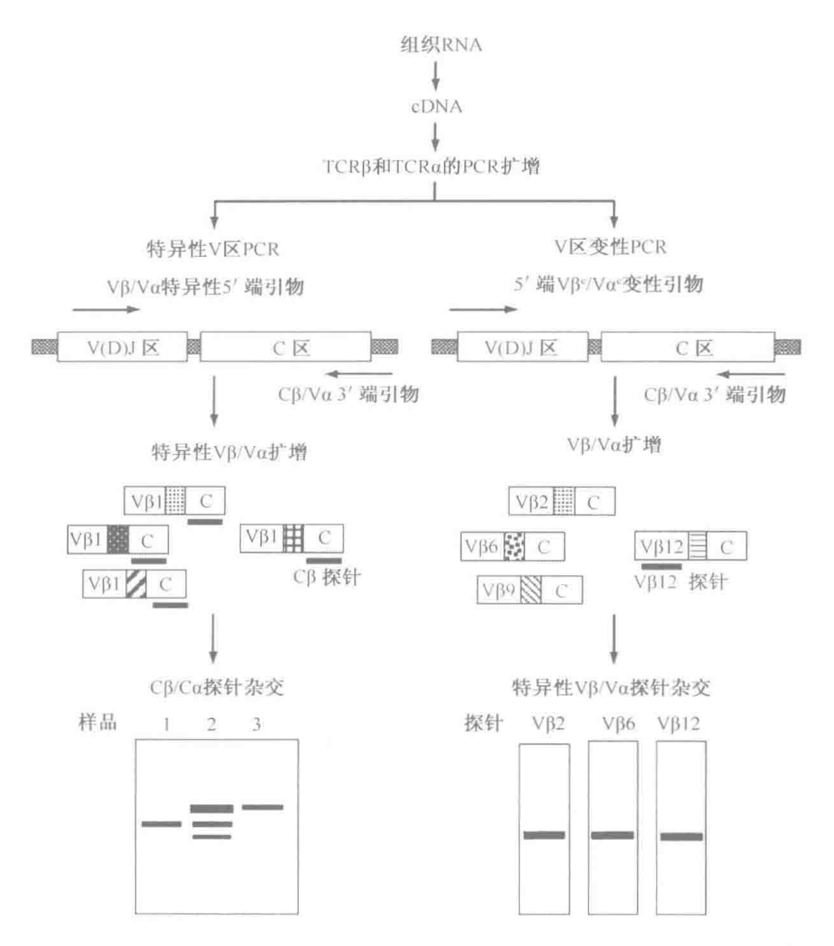


图 14.7.1　PCR 检测 TCR 基因表达。组织 RNA 和 cDNA 准备（见辅助方案）。PCR 分析 TCR 基因表达有两种方法，第一种方法，特异性 V 区 5′引物和一个 3′C 区引物扩增所有的含特异 V 基因的 TCR 转录物。产物同 C 区基因探针杂交检测条带。第二种方法，V 区 5′兼并引物和一个 3′C 区引物扩增含相关 V 区的 TCR 转录物。

50μmol/L 评估 cDNA 质量的引物储存液（－80 ℃保存）：如 β-action 或者是其他管家基因

50μmol/L TCR 引物储存液（－80℃保存）：V 区 5′引物：Vβ 或者 Vα（特异）或者是 $V\beta^c$ 或者是 $V\alpha^c$（兼并）。C 区引物：$C\beta_{uni}$ 或者 Cα（表 14.7.1）

√2mmol/L 4dNTP 混合液（如 Promega）

√10×PCR 扩增缓冲液

10U/μl *Taq* DNA 聚合酶（如 Perkin -Elmer）

矿物油

√6×凝胶加样缓冲液

TAE 配制 1%～2%（*m*/*V*）琼脂糖凝胶，含 0.5μg/ml 溴化乙锭（附录 1）

碱裂解液：0.5mol/L NaOH/1.5mol/L NaCl

中和液：1mol/L Tris · Cl，pH8.0（附录 1）/1.5mol/L NaCl

吸水纸

尼龙膜：如 Magnacharge（Fisher）或者 GeneScreen Plus（DuPont NEN）

√10×和 5×SSC

2500～3000Ci/mmol [α-^{32}P] CTP 标记随机引物探针（CPI 单元 10.10）检测 cDNA储存液：如 β-actin

2500～3000Ci/mmol [α-^{32}P] CTP 标记随机引物探针（CPI 单元 10.10）Cα 和 Cβ 或者是从 cDNA、基因组克隆来的特异性 Vβ 探针

√预杂交溶液（现配）

√杂交溶液（现配）

漂洗液：0.2×SSC/0.1%（*m/V*）SDS（过滤）

PCR 仪：PerkinElmer480 或类似仪器

UV 交联剂（如 UV Stratalinker，Stratagene）或者是短波 UV

可加热封接袋和真空封接机，或者是杂交瓶和杂交炉

沸水浴

X 射线胶片和放射自显影扫描仪，或者是 PhosphorImager 盒和 PhosphorImaging 扫描仪（Moleular Dynamics）

1. 正常小鼠组织提取 RNA，反转录成 cDNA（见辅助方案）。
2. 在分析 TCR 基因表达前，先按步骤 3～8 用适当的引物和探针检测管家基因，如 β-actin 的表达。
3. 在 0.5ml 微离心管里准备反应原液，按照下面的配方乘以总份数，放于冰上：

   17.35μl 无菌水

   0.25μl 50μmol/L 5′ 特异或是 V 区兼并引物

   0.25μl 50μmol/L 3′ C 区引物

   2.5μl 2mmol/L 4dNTP 混合液

   2.5μl 10×PCR 扩增缓冲液

   0.165μl 10U/μl *Taq* DNA 聚合酶。

   两个 PCR 反应分别获得 TCRα 和 TCRβ 转录物。吸取 23μl 上述原液到每个微离心管，放于冰上，加入 2μl cDNA（50pg～100ng）。混匀，加入几滴矿物油。

4a. TCRβ 或者是 TCRα V 区引物或者 5′和 3′ actin 引物的扩增参数：

30 个循环：	30s	94℃
	30s	55℃
	1min	72℃。

4b. Vα^{C} 和 Vβ^{C} 共有引物的扩增参数，以如下的参数进行 PCR 扩增：

3 个循环：	1min	94℃
	1min	37℃
	1min	72℃
27 个循环：	30s	94℃
	30s	55℃

1min　72℃。

5. 从矿物油下吸取 25μl PCR 产物，在干冰上快速冻结。样品中加入适量的 6×凝胶上样缓冲液。在含溴化乙锭 1.5%～2.5%的琼脂糖凝胶电泳。
6. 凝胶在 2～3 倍体积的碱裂解液中浸泡 15min，然后在 2～3 倍体积中和液浸泡 10min。通过吸收 10×SCC，使 DNA 转移到尼龙膜上。至少印迹 12h。5×SSC 漂洗。吸水纸吸水 5～10min。UV 交联（CPI 单元 10.10），使 DNA 固定在膜上。
7. 5×SSC 浸湿尼龙膜。转移到杂交袋或者是杂交瓶，加入预杂交液，42℃搅拌水浴中预杂交 1h。弃除预杂交液，^{32}P 标记探针（10^6/ml 杂交液）煮沸 3min，立即加入杂交液。然后转移到杂交袋或者杂交瓶中 42℃杂交 12～16h。
8. 杂交膜用洗涤液 55℃洗 5min。重复 2～3 次。印迹膜晾干，包到玻璃纸里。X 射线胶片曝光 1～12h 或者 PhosphorImager 盒显影 30min～4h。

基本方案 2　PCR 检测小鼠 TCR 可变区的频率

材料（其他材料见基本方案 1）

用于磷相仪和光密度扫描仪的 ImageQuant 软件（Molecular Dynamics）

1. 选择感兴趣的 Vβ 或者 Vα 引物（基本方案 1，步骤 1～4），PCR 扩增样品中所有含 Vβ 或者 Vα 基因。
2. 如上，进行第二次 PCR，利用 5′Cβ～3′$C\beta_{Rev}$或者是 5′Cα～3′$C\alpha_{Rev}$扩增样品中的所有 TCR 分子。
3. PCR 共扩增步骤 1 和步骤 2 中的反应体系，参数如下：

   30 个循环：　30s　94℃

   　　　　　　30s　37℃

   　　　　　　1min　72℃。
4. 每管 PCR 样品，加入凝胶上样缓冲液；步骤 1 和步骤 2 中的共扩增产物在同一块琼脂糖凝胶上电泳，印迹到尼龙膜上（见基本方案 1，步骤 5～6）。
5. 同 Cβ 或者 Cα 标记探针杂交，X 射线胶片曝光或者是 PhosphorImager 盒曝光（见基本方案 1，步骤7～8）。
6. 利用 ImageQuant 或者是其他光密度软件对 PCR 反应的每个样品的杂交信号定量。根据下面的公式对样品中含特异 Vβ 或者 Vα 的 TCR 转录物的总频率做出正确的评估：

$$\%V\beta\text{-}X \text{ 或 } V\alpha\text{-}X=\frac{\text{步骤 1 产物的杂交信号强度}}{\text{步骤 2 产物的杂交信号强度}}$$

基本方案 3　对小鼠可变区转录物进行 PCR 定量

对基本方案 2 做了些修改，便于准确地对样品中含有特异 Vβ 或者 Vα 的 TCR 转录产物定量（图 14.7.2）。

材料（带√项目见附录 1）

0.8%（*m/V*）琼脂糖凝胶，含 0.5μg/ml 溴化乙锭的 1×TAE 配制（附录 1）

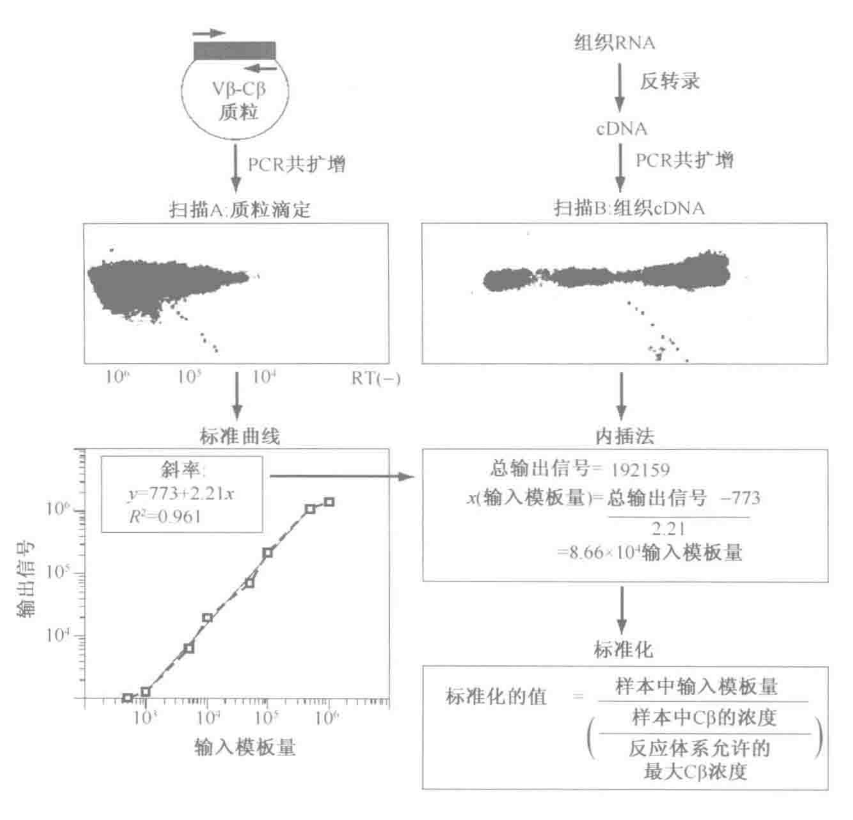


图 14.7.2　TCRβ 定量 PCR 方法。所有的 RNA 样本同时反转录。待测样品和不同浓度的标准质粒 DNA 共扩增。Molecular Dynamics PhosphorImager 对 Southern 印记定量。举例说明，$5\times10^3\sim10^6$ 个输入端质粒模板分子同 Cβ 杂交（得到扫描 A）；Lane 8 包括 RT（—）阴性对照。质粒和待测样品用 5′特异性 Vβ 基因引物和 3′$C\beta_{uni}$ 基因引物同时进行 PCR 扩增，然后同 Cβ 杂交（得到扫描 B）。扫描 A 作标准曲线，用来比较分子数目和输出端信号（total pixel）。标准曲线在 3 数量级的输入端模板内为线性。这样通过输出端信号强度就可以定量每个待测样品。

胶回收试剂（如 Qiaex II 凝胶提取试剂盒，Qiagen 或者 CPI 单元 10.5）

$AP^r\beta$-gal^+ 克隆载体。来自于 PCR-克隆试剂盒（如 TA 质粒，Invitrogen）或者商业化质粒（如 pBluescript，或者 pUC 载体）

10μg/ml tRNA carrier 无菌水配制

100％乙醇，−20℃

Amp^s，β-gal^- *E. coli* 感受态细菌（如 X1-Blue，Stratagene），可电转

√2×YT 培养基，含 50μg/ml 氨苄青霉素

√LB 琼脂平板含 50μg/ml 氨苄青霉素，IPTG/Xgal 处理

1mg/ml 超声 *E. coli* DNA（Pharmacia Biotech）

1mg/ml RNase A

5′Cβ- 3′$C\beta_{Rev}$或者 5′Cα-3′$C\alpha_{Rev}$引物

电穿孔仪器（如 Gene Pulser，Bio-Rad）

用于磷相仪和光密度扫描仪的 ImageQuant 软件（Molecular Dynamics）

37℃细菌培养箱和摇床

1. 从正常小鼠的脾脏或淋巴结提取 RNA，通过反转录得 cDNA（见辅助方案）。扩增每个感兴趣的 Vβ-Cβ 或者是 Vα-Cα 转录产物（见基本方案 1，步骤 3～4）。
2. 在含溴化乙锭的 0.8%的琼脂糖中跑胶。切取目标条带所在的位置，根据 Qiaex 试剂说明进行胶回收。无菌水重悬 DNA，浓度为 10～50ng/μl。
3. 直接克隆到 Ap^r β-gal^+ PCR 载体上。或者对扩增产物进行酶切（表 14.7.1），定向克隆到传统的 Ap^rβ-gal^+ double-cut 载体中，如 pBluescript 或 pUC 载体。
4. 连接产物进行脱盐，每个连接产物中加 10μg tRNA 携带体和等体积的－20℃的无水乙醇，4℃，10 000*g* 离心 15min。弃去上清，20μl 无菌水重悬沉淀。
5. 10μl（50%）脱盐连接产物电穿孔转化 50μl 感受态 Amp^sβ-gal^- *E. coli*，转化产物涂于含 50μg/ml 氨苄青霉素和 IPTG/Xgal 处理的 LB 琼脂糖平板。

   磷酸钙转化或其他方法（CPI 单元 10.13、10.14、10.16）可以代替电穿孔方法。

6. 挑取克隆到 5ml 含 50μg/ml 氨苄青霉素的 2×YT 培养基中培养过夜。碱裂解法或者其他方法提取质粒 DNA。
7. 酶切（CPI 单元 10.8），反应体系含 0.5μl 的 1mg/ml RNase（终浓度微 25ng/μl），电泳检测酶切结果。
8. 测浓度并连续稀释成不同浓度保存。每个浓度取 2μl 作为模板，进行 PCR 扩增（见基本方案 1，步骤 3～4）。
9. 准备每个实验细胞样品 cDNA（见辅助步骤）。在样品 cDNA 和质粒模板储存液（终浓度为 50ng/μl）分别加入 *E. coli* DNA，确保扩增起始，每个 PCR 管子的无关 DNA 浓度一致。样品和每个 TCRβ 或者是 TCRα 的标准质粒 DNA 模板一起扩增（见基本方案 1，步骤 3～4）。
10. 用 5′Cβ-3′$Cβ_{Rev}$或者是 5′Cα-3′$Cα_{Rev}$引物扩增样品（见基本方案 2，步骤 2 和 3）。
11. 同一块胶电泳分离步骤 9 和步骤 10 的 PCR 产物，并将其转移到尼龙膜上（见基本方案 1，步骤 5 和 6）。
12. 标记的 Cβ 或者 Cα 探针与尼龙膜放射杂交（见基本放案 1，步骤 7～8）。
13. PhosphorImaging Scanner 或者是放射自显影扫描仪和 ImageQuant 软件对每道的杂交信号定量。
14. 通过每个泳道质粒标准模板得到的数值（步骤 9），得到输入端模板数量和输出端信号强度的标准曲线。

    通过信号强度进行定量，利用曲线斜率（$y=mx+b$），得出每个实验样品的输入端模板数量。

15. 关于步骤 10 的 PCR 反应，可得到每个实验样品的杂交信号强度和反应体系中最强信号的比例。对于每个实验样品，步骤 14 得到的数值除以这个比例。

    这一步可以对所有的样品和对照规范化。降低样品中的输入 cDNA 的数量差异。

基本方案 4　序列分析 V（D）J 区的接头多样性

因为每对 PCR 引物的效率都不同，所以只有比较两个不同的文库时，该方法评估 Vβ 和 Jβ 基因才有效。

材料（带√项目见附录 1）

组织匀浆样本或者是溶解在 HBSS（附录 1）中组织样本的单细胞悬液（10^4～10^7）
E. coli 菌株（如 X1-Blue，Stratagene）
√LB 琼脂糖平板含正确的抗生素
噬菌体载体，如 M13mp 18，19，20 或 21
硝酸纤维素膜，如 Magnachare（Fisher）
[α-^{32}P] CTP 标记特异 Vβ 寡核苷酸探针（表 14.7.2；随机引物标记；CPI 单元 10.10）
[γ-^{32}P] ATP 标记特异 Jβ 寡核苷酸探针（表 14.7.2；多核苷酸激酶标记；CPI 单元 10.10）
√寡核苷酸预杂交溶液（现配）
√寡核苷酸杂交溶液（现配）
双脱氧法测序试剂（US Biochemicals）

表 14.7.2　T 细胞受体 Jβ 寡核苷酸[a]

Jβ 引物	序列
Jβ1.1	5′-CAC AGA ACT CTT CTT TGG TAA A-3′
Jβ1.2	5′-CTC CGA CTA CAC CTT CGG CTC A-3′
Jβ1.3	5′-AAA TAC GCT CTA TTT TGG AGA A-3′
Jβ1.4	5′-CTA AAC ATT ATT TTT CGG TCA T-3′
Jβ1.5	5′-ACC AGC TCC GCT TTT TGG AGA G-3′
Jβ1.6	5′-TTC GCC CCT CTA CTT TGC GGC-3′
Jβ2.1	5′-TGC TGA GCA GTT CTT CGG ACC A-3′
Jβ2.2	5′-CGG GCA GCT CTA CT TGG TGA A-3′
Jβ2.3	5′-AGA AAC GCT GTA TTTT TGG CTC A-3′
Jβ2.4	5′-AAA CAC CTT GTA CTT TGG TGC A-3′
Jβ2.5	5′-ACA CAC CCA GTA CTT TGG GCC A-3′
Jβ2.6	5′-AGT CTG CGA ACA GGG GTG GGT G-3′

a. 信息由 Galley 和 Danska 整理（1995）。

1. 靶组织中提取 RNA，反转录得到 TCRβ cDNA（见辅助方案）。扩增 TCR 基因转录产物，（见基本方案 1，步骤 3～4），克隆到噬菌体质粒载体，转化合适的大肠杆菌，获得文库（见基本方案 3，步骤 2～6）。
2. 转化的噬菌粒涂到正确的菌株上面。进行文库滴定，扩增，保存和筛选转化菌。

关于噬斑的细节，噬菌粒文库的处理，噬斑转移到硝酸纤维膜，噬斑的杂交，

参考噬菌粒商家提供的信息，CPMB 第 6 章或 Sambrook 和 Russell（2001）。

3. 噬斑在选择性 LB 琼脂糖培养平板里培养过夜。转移噬斑到硝酸纤维膜。每块板子准备一个复板，用复板进行杂交。
4. 作为阳性对照，通过与［α-^{32}P］CTP 标记的 Vβ 探针杂交（对应于步骤 1）筛选一个复板。每个文库准备几块平板，每块平板含有 $3\times10^3\sim50\times10^3$ 个噬斑。
5. 纤维膜在寡核苷酸预杂交液里孵育 2h，45℃水浴，期间不断搅拌。弃去预杂交液，加入含 2×10^6/ml［γ-^{32}P］ATP 标记特异 Jβ 寡核苷酸探针的杂交液，在 45℃不断搅拌水浴中，至少杂交 16h。
6. 轻轻搅拌洗涤液，标记的纤维膜在洗涤液室温漂洗 10min。49℃洗涤 10min。然后按照表 14.7.3 方法洗涤，每次 10min。最后一个温度重复一次，晾干，曝光过夜。
7. 计数每个 Jβ 探针杂交的噬斑，除以 Vβ 探针杂交的噬斑总数目，确定 cDNA 文库中 Jβ 杂交的频率。
8. 从感兴趣的克隆中得到单链 DNA 模板。

   该步骤需要纯化单个噬菌体噬斑，经常要重复筛选低密度平板。

   关于噬菌粒噬斑的单链 DNA 模板制备的细节，见 CPMB 7.3 节或者 Sambrook 和 Russell。假如是质粒载体（见基本方案 3），双链质粒 DNA 也能测序（见 CPI 单元 10.25）。
9. 双脱氧终止法测序（单元 14.6），使用通用引物（如 M13 正向和反向）或者是 TCR 特异引物（如 $C\beta_{uni}$）。

表 14.7.3　第三次洗涤的温度

^{32}P 探针	温度/℃
Jβ1.1,1.2,1.4～1.6	49
Jβ1.3	52
Jβ2.1	57
Jβ2.2	59
Jβ2.3	62
Jβ2.4	65
Jβ2.5	65
Jβ2.6	62

辅助方案　cDNA 合成用于小鼠 TCR 基因表达的 PCR 分析

材料（带√项目见附录 1）

√HBSS

　组织匀浆或者是单个细胞悬浮在 HBSS（$10^4\sim10^7$ 个细胞）

　10μg/ml 糖原转运体（Boehringer Mannheim）

√胍盐溶液

　0.5mol/L Tris · Cl，饱和酚，pH8.0（CPI 单元 10.1；RNA 用 pH4.0 的 Tris 缓冲液）

　氯仿

　异丙醇，无 RNase

　80%乙醇，无 RNase，−20℃

　DEPC 处理无菌水

　20pg/μl oligo-dT 引物（Promega）

√5×RT 反应缓冲液

√5mmol/L 4dNTP 混合物（Promega）

1mg/ml 分子级牛血清白蛋白（BSA；Boehringer Mannheim）

鸟类成髓细胞性白血病病毒（AMV）反转录酶（RTase；Promega；在无菌 DEPC 水中稀释到 3U/μl）

RNase 抑制剂：33U/μl RNasin（Promega）

1mg/ml 超声处理 *E. coli* DNA（Pharmacia Biotech）

1.5ml 无菌微离心管

注：所有的溶液要用无菌的 DEPC 水配制，灭活 RNase 活性。

1. 在 1.5ml 无菌微离心管中加入 10^4～10^6 个细菌，离心，20～50μl HBSS 重悬细菌沉淀。
2. 5～10μg 糖原载运体在 200μl 异硫氰酸胍溶液里乳糜化。加入 200μl Tris 饱和酚和 40μl 氯仿。振荡，室温，10 000*g* 离心 15min。吸取水相到 1.5ml 清洁微离心管中，再加入等体积的苯酚和 1/10 体积氯仿。振荡，室温，10 000*g* 离心 15min。
3. 转移水相层到干净的管子去除残余的苯酚，加入等体积的氯仿。振荡，4℃，10 000*g* 离心 15min。再次吸取水相层到干净的管子，加入等体积的无 RNase 异丙醇，4℃，最大速度离心 15min。用预冷的无 RNase 的 80%乙醇洗涤沉淀。倒置离心管，风干 15min。风干后－70℃保存或者反转录成 cDNA。
4. 无菌 DEPC 水溶解并稀释 RNA 为 0.05～100ng/μl（每 10^3 新鲜分离的细胞可得到约 1ng RNA）。
5. 吸取 10μl RNA 溶液（0.5～1000ng）到无菌 1.5ml 微离心管中，加入 1.5μl 20pg/μl oligo-dT 引物，轻弹离心管使之混合，瞬时离心。65℃孵育 10min，放于冰上停止反应。
6. 根据下面的配方乘以份数准备 RT 原液。

   4μl 5×RT 反应缓冲液

   2μl 5mmol/L 4dNTP 混合液

   1μl 1mg/ml BSA

   1μl 3U/μl AMV RTase（共 3U）

   0.25μl 33U/μl RNasin（共约 8U ）。

   每个 RNA 样品加入 8.25μl RT 原液，DEPC 水补到 20μl，瞬时离心。每个cDNA都配无 RTase 的平行反应做为阴性对照。42℃孵育 45min～1h。
7. 转移到 95℃放置 5min，冰上终止反应。加入适量的 *E. coli*，使得 DNA 总浓度为 50ng/μl。－20℃储存。

撰稿人：Casey J. Fox and Jayne S. Danska

单元 14.8 TCR 库的抗原谱/免疫扫描技术分析

免疫扫描技术分析利用 PCR 技术扩增模板 cDNA，从 TCR 可变区基因中扩增不同长度的重排 CDR3 cDNA 模板（图 14.8.1A）。

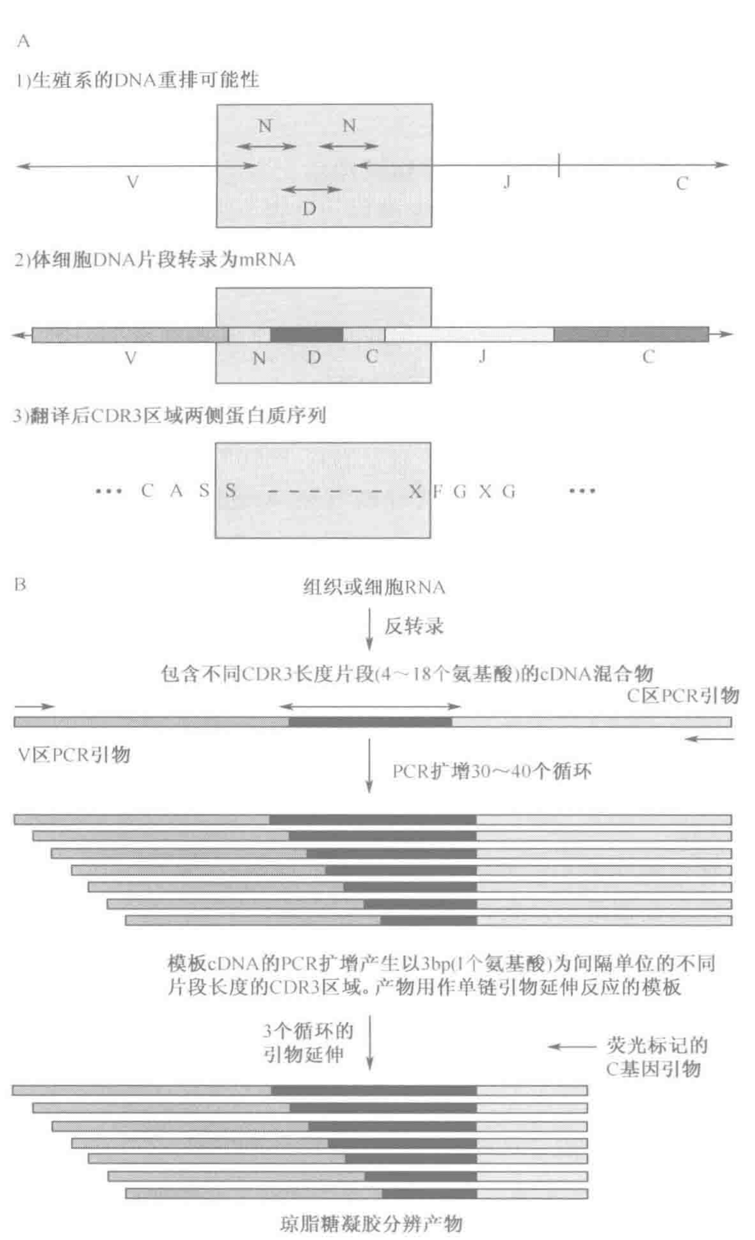


图 14.8.1　A. TCR 基因的 CDR3 区检测。(1) TCRβ 链的 CDR3 区在生殖细胞 V、D、J 基因片段重排时形成，其 N 端核苷酸随即插入到接合区。而 TCRα 链不含 D 基因 N 端核苷酸随即插入到 V-J 接合区。(2) 一旦重排成功，TCR 基因就能转录成 mRNA 和表达蛋白。(3) CDR3 蛋白的两侧分别为 V 基因 C 端的 CAS 基序和 J 基因 N 端的 FGXG 基序。B. 免疫扫描分析的主要步骤。免疫扫描分析 TCR 的多态性有两种方法：(1) 特异 5′V 基因引物和特异的 3′C 基因引物 PCR 扩增 TCR 转录物。利用荧光标记的 C 基因 3′套式引物，PCR 产物作为引物延伸 (run-off) 的模板。自动测序仪检测 run-off 产物。(2) PCR 同上，但扩增过程中对产物进行放射标记。产物直接测序。

基本方案 1　人和小鼠 TCR 受体库多样性的免疫扫描技术分析

材料（带√项目见附录 1）

细胞种类（如纯化的 T 细胞）或者组织样品

20μmol/L β-actin 引物（或其他管家基因；见表 14.8.1；−70℃保存）

1.5%（m/V）琼脂糖凝胶，含 0.5μg/ml 溴化乙锭的 1×TBE 配制（附录 1）

无 DNase 的灭菌水

10×PCR 扩增缓冲液含 15mmol/L $MgCl_2$（如 PCR 缓冲液 I，PE Biosystem）

√1.25mmol/L 4dNTP 混合液（如 Pharmacia）

20μmol/L 人（表 14.8.1 和表 14.8.2）或者鼠（表 14.8.3）TCR 恒定区基因（C 基因）引物（HTCA3 或者 HTCB3；−70℃储存）

用于 PCR 热启动的 5U/μl *Taq* 聚合酶（如 AmpliTaq Gold，PE Biosystem，或 Platiunu *Taq* 聚合酶，Life Technologies）和 5U/μl Taq 聚合酶（如 AmpliTaq，PE Biosystem）

20μmol/L AV 和 BV 人（表 14.8.1 和表 14.8.2）或者小鼠（表 14.8.3 和表 14.8.4）TCR 引物（−70℃储存）

4μmol/L 5′荧光（6-FAM）标记的 C 基因套式引物，HTCA1-FAM 或 HTCB1-FAM，或小鼠相应引物（表 14.8.1～表 14.8.4；−70℃储存）

4%（m/V）变性聚丙烯酰胺测序胶

去离子甲酰胺

GeneScan 泳道标准物 GS-500 TAMRA（PE Biosystem）

EDTA/蓝色右旋糖酐上样染料（PE Biosystem）

0.6ml 或 0.3ml 无菌 PCR 扩增管，或 96 孔 PCR 反应矩阵板（如 Marsh Biomedical）

可调热盖 PCR 仪（如 MJ Research 或者 PE Biosystem）

自动测序仪，带 GeneScan 安装软件（如 ABI PRISM model 377，PE Applied Biosystem）

36 道 Sharkstooth 梳子

注意：如果实验用到人血液、细胞或者感染试剂，必须严格按照生物安全指南操作（见前言）。

表 14.8.1　人 TCRA 引物[a]

引物	序列	到 CDR3 的距离[b]/bp
V gene 引物		
HAV1A	TCTGGTATGTGCAATACCCCAACC	179
HAV1B	CTGAGGAAACCCTCTGTGCA	54
HAV2	GATGGAAGGTTTACAGCACAGCTC	102
HAV3	CACAGTGGAAGATTAAGAGTCACGC	105
HAV4A	AACAGAATGGCCTCTCTGGC	102

续表

引物	序列	到 CDR3 的距离[b]/bp
V gene 引物		
HAV4B	GGATTGCGCTGAAGGAAGAG	241
HAV5	TGAAGGTCACCTTTGATACCACCC	82
HAV6	AATCCGCCAACCTTGTCATCTCCG	65
HAV7	AACTGCACGTACCAGACATC	210
HAV8	ACCCTGAGTGTCCAGGAGGG	249
HAV9	CACTGCTGACCTTAACAAAGGCG	91
HAV10	TCCTGGTGACAGTAGTTACG	140
HAV11	AGGCTCAAAGCCTTCTCAGCAGGG	115
HAV12	TCCACCAGTTCCTTCAACTTCACC	72
HAV13	TTCATCAAAACCCTTGGGGACAGC	164
HAV14	CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT	162
HAV15	GGATAAACATCTGTCTCTGCG	70
HAV16	GATAGCCATACGTCCAGATG	136
HAV18	TGCCACTCTTAATACCAAGGAGGG	88
HAV19	ACACTGGCTGCAACAGCATC	172
HAV20	TTACAAACGAAGTGGCCTCC	107
HAV21	ACCCTGCTGAAGGTCCTACATTCC	161
HAV22	CTTGGAGAAAGGCTCAGTTC	55
HAV23	TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG	88
HAV24	TCCCAGCTCAGCGATTCAGCCTCC	39
HAV25	GTCCTGTCCTCTTGATAGCC	149
HAV26	AGCCCAGCCATGCAGGCATCTACC	35
HAV27	TTGATACCAAAGCCCGTCTC	80
HAV28	GAACATCACAGCCACCCAGACCGG	52
HAV29	GCAAAGCTCCCTGTACCTTACGG	64
HAV30	TTTCTGCACAGCACAGCCCC	57
HAV31	AGCAAAAACTTCGGAGGCGG	99
HAV32	AAGGAGAGGACTTCACCACG	230
C gene 引物		
HTCA3	GTTGCTCTTGAAGTCCATAGACC	
HTCA1-FAM[c]	FAM-GCAGACAGACTTGTCACTGG	102
β-actin 引物		
Actin-F	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA	
Actin-R	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG	

a. 引物序列引自 Han 等（1991），所有引物均为 5′端到 3′端方向。

b. 对于 V 区引物，到 CDR3 的长度从第一个与引物 5′端互补的碱基开始计算直到 CDR3 区之前 V 区最后一个碱基为止。相应的，C 区引物到 CDR3 的长度从 CDR3 后 J 区第一个碱基开始计算直到最后一个与引物 5′端互补的碱基为止（3′端引物）。

c. C 区失控引物（run-off primer）应在 5′端用一种能够被自动化测序仪检测到的荧光染料标记。6-FAM 是已被成功应用于许多实例的一种染料，但其他如 HEX、TET、ROX 和 NED 等染料也被使用，建议在使用一种新染料前先查阅仪器说明书。

表 14.8.2 人 TCRB 引物[a]

引物	序列	到 CDR3 的距离[b]/bp
V gene 引物		
HBV1	CGCACAACAGTTCCCTGACT	85
HBV2	TCAACCATGCAAGCCTGA	83
HBV3	GTCTCTAGAGAGAAGAAGGAGCGC	84
HBV4	GAGGCCACATATGAGAGTGG	126
HBV5A	TCAGTGAGACACAGAGAAAC	131
HBV5B	TGTGTCCTGGTACCAACAGG	187
HBV6	CTCAGGTGTGATCCCAATTTC	222
HBV7	GCTCTCACCTGAATGCCCC	92
HBV8	TCTGGTACAGACAGACCATG	185
HBV9	CCTAAATCTCCAGACAAAGC	84
HBV11	TCAACAGTCTCCAGAATAGGACG	90
HBV12	CATGGGCTGAGGCTGATC	159
HBV13A	CGACAAGACCCAGGCATGGG	174
HBV13B	AGACAAGATCTAGGACTGGG	174
HBV14	GTCTCTCGAAAAGAGAAGAG	84
HBV15	GTGTCTCTCGACAGGCACAG	86
HBV16	AGTCTAAACAGGATGAGTCCG	128
HBV17	GGAGATATAGCTGAAGGGTA	108
HBV18	GAGTCAGGAATGCCAAAGGA	114
HBV20	CAGCTCTGAGGTGCCCCAGA	112
HBV21	TCACAGTTGCCTAAGGATCG	111
HBV22	GCAGAAAGTCGAGTTTCTGG	163
HBV23	GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCCA	172
HBV24	ACAATGAAGCAGACACCCCT	116
HBV25	TAAGTGCCTCCCAAATTCAC	82
C gene 引物		
HTCB3	GACAGCGGAAGTGGTTGCGGGGT	319
HTCB1-FAM[c]	FAM-TTGGGTGTGGGAGATCTCTGC	105

a. 引物序列引自 Currier 等（1996），所有引物均为 5′端到 3′端方向。

b. 对于 V 区引物，到 CDR3 的长度从第一个与引物 5′端互补的碱基开始计算直到 CDR3 区之前 V 区最后一个碱基为止。相应的，C 区引物到 CDR3 的长度从 CDR3 后 J 区第一个碱基开始计算直到最后一个与引物 5′端互补的碱基为止（3′端引物）。

c. C 区失控引物（run-off primer）应在 5′端用一种能够被自动化测序仪检测到的荧光染料标记。6-FAM 是已被成功应用于许多实例的一种染料，但其他如 HEX、TET、ROX 和 NED 等染料也被使用，建议在使用一种新染料前先查阅仪器说明书。

表 14.8.3　小鼠 TCRA 引物[a]

引物	序列	到 CDR3 的距离[b]/bp
V gene 引物		
MuAV1A	ATCTTCTCTGATGGTGACAAGAAAG	127
MuAV1B	ATCTTCTCCAATGGTGAAAAAGAAG	127
MuAV2[c]	AAAGGGAGAAAAAGCTCTCC	74
MuAV3	ACCCAGTGGTTCAAGGAGTG	119
MuAV4L	GTGCAGTATCCCGGAGAAGG	168
MuAV4S	CTTGCAGAAAGCCTCAGTGCA	55
MuAV5[c]	CAAGAAAGACAAACGACTCTC	76
MuAV6	TTTCCTGGCTATTGCCTCTGAC	97
MuAV7	ATTCTGTAGTCTTCCAGAAATCAC	92
MuAV8	CAACAAGAGGACCGAGCACC	118
MuAV10	CAATCCTTCTGGGACAAAGCA	124
MuAV11	GCACATCAGGGATGCCCAGC	52
MuAV12[c]	TCTGTTTATCTCTGCTGACC	94
MuAV13	ACCTGGAGAGAATCCTAAGC	160
MuAV14[c]	GACAAAACGTCAAATGGG	114
MuAV15[c]	AAGCTGGAAAGGGTCTCCAC	161
MuAV16	TCTCCTTACATATAACAGCTGCA	59
MuAV17	TTCCATCGGACTCATCATCAC	64
MuAV18	CTTGACACCTCCAGCCAGAG	81
MuAV19	AGCCGCTCGAATGGGTACAG	79
MuAV20	CGTACGCTCAAATGTGGATAAG	130
C gene 引物		
MuTCA3	CATGTCCAGCACAGTTTTGTCAGT	
MuTCA1-FAM[d]	FAM-GTCAAAGTCGGTGAACAGGC	120

a. 除非有注明，所有引物都是新发现未发表的序列，并且和表达文库有较高的匹配性。所有引物均为 5′端到 3′端方向。

b. 对于 V 区引物，到 CDR3 的长度从第一个与引物 5′端互补的碱基开始计算直到 CDR3 区之前 V 区最后一个碱基为止。相应的，C 区引物到 CDR3 的长度从 CDR3 后 J 区第一个碱基开始计算直到最后一个与引物 5′端互补的碱基为止（3′端引物）。

c. 所有信息和引物数据由 Blish 等（1999）搜集。

d. C 区失控引物（run-off primer）应在 5′端用一种能够被自动化测序仪检测到的荧光染料标记。6-FAM 是已被成功应用于许多实例的一种染料，但其他如 HEX、TET、ROX 和 NED 等染料也被使用，建议在使用一种新染料前先查阅仪器说明书。

表 14.8.4　小鼠 TCRB 引物[a]

引物	序列	到 CDR3 的距离[b]/bp
V gene 引物		
MuBV1	CTGAATGCCCAGACAGCTCCAAGC	83
MuBV2	TCACTGATACGGAGCTGAGGC	74
MuBV3.1	CCTTGCAGCCTAGAAATTCAGT	63
MuBV4	GCCTCAAGTCGCTTCCAACCTC	102
MuBV5.1	CATTATGATAAAATGGAGAGAGAT	135
MuBV5.2	AAGGTGGAGAGAGACAAAGGATTC	126
MuBV5.3	AGAAAGGAAACCTGCCTGGTT	113
MuBV6	CTCTCACTGTGACATCTGCCC	56
MuBV7	TACAGGGTCTCACGGAAGAAGC	90
MuBV8.1N[c]	GGCTGATCCATTACTCATATGTC	149
MuBV8.2N[c]	TCATATGGTGCTGGCAGCACTG	136
MuBV8.3	TGCTGGCAACCTTCGAATAGGA	127
MuBV9	TCTCTCTACATTGGCTCTGCAGGC	57
MuBV10	ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGGA	48
MuBV11	GCACTCAACTCTGAAGATCCAGAGC	64
MuBV12	GATGGTGGGGCTTTCAAGGATC	114
MuBV13N[c]	AGGCCTAAAGGAACTAACTCCACT	78
MuBV14	ACGACCAATTCATCCTAAGCAC	68
MuBV15	CCCATCAGTCATCCCAACTTATCC	87
MuBV16	CACTCTGAAAATCCAACCCAC	58
MuBV17N[c]	CTAAGTGTTCCTCGAACTCAC	83
MuBV18	CAGCCGGCCAAACCTAACATTCTC	82
MuBV19	CTGCTAAGAAACCATGTACCA	74
MuBV20	TCTGCAGCCTGGGAATCAGAA	62
C gene 引物		
MuTCB3C	AAGCACACGAGGGTAGCCT	
MuTCB1-FAM[d]	FAM-TTGGGTGGAGTCACATTTCTC	59

a. 除非有注明，所有信息和引物数据均由 Pannetier 等（1993）搜集。

b. 对于 V 区引物，到 CDR3 的长度从第一个与引物 5′端互补的碱基开始计算直到 CDR3 区之前 V 区最后一个碱基为止。相应的，C 区引物到 CDR3 的长度从 CDR3 后 J 区第一个碱基开始计算直到最后一个与引物 5′端互补的碱基为止（3′端引物）。

c. 所有引物都是新发现未发表的序列，并且和表达文库有较高的匹配性。

d. C 区失控引物（run-off primer）应在 5′端用一种能够被自动化测序仪检测到的荧光染料标记。6-FAM 是已被成功应用于许多实例的一种染料，但其他如 HEX、TET、ROX 和 NED 等染料也被使用，建议在使用一种新染料前先查阅仪器说明书。

1. 从细胞或者组织样品中纯化 RNA（CPI 单元 10.11），并反转录成 cDNA（单元 14.7）。
2. 在免疫扫描技术分析 TCR 基因前，PCR 检测管家基因如 β-actin 确保 cDNA 的质量（步骤 4～7，如下），以 cDNA 1∶1、1∶5、1∶10 稀释作为模板，用 β-actin 引物（表 14.8.1）。

3. 3～5μl PCR 产物在 TBE 配制的含溴化乙锭 1.5%琼脂糖凝胶上电泳。
4. 在 1.5ml 微离心管中准备两份原液，一份为 TCRAV，另一份为 TCRBV 引物。根据下面的配方乘以样品份数，因为加样过程有损失，要多配 1～2 份（42.5μl/次反应）。

   26.8μl 无菌水
   5.0μl 10×PCR 扩增缓冲液
   8.0μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合液
   2.5μl 20μmol/L C 基因引物（HTCA3、HTCB3、小鼠对应引物）
   0.2μl 5U/μl ，AmpliTaq Gold DNA 聚合酶。

   振荡，瞬时离心，冰上放置。
5. 5μl 模板 cDNA 加入到 0.3ml 或 0.6ml PCR 扩增管，或者 96 孔 PCR 阵列盘，其中一孔用等体积缓冲液代替作为阴性对照。
6. 每管加入 42.5μl 原液和 2.5μl 20μmol/L AV 或 BV 引物，无菌水补到 50μl。振荡，瞬时离心。
7. PCR 反应参数如下：

1 个循环	10min	95℃	激活 AmpliTaq Gold 酶
35 个循环	30s	95℃	变性
	30s	60℃	复性
	90s	72℃	延伸
1 个循环	10min	72℃	延伸。

   第一次使用 cDNA 模板，建议在 TBE 配制的 1.5%琼脂糖上电泳 3～5μl PCR 产物。为了提高信噪比，循环数可增加到 40。

   反应产物如果不立即用掉，可于－20℃短期保存 1 个月，长期保存则建议放在－70℃。
8. 准备 5′端用 6-FAM 标记的 AC 或者 BC 基因套式引物原液如下，每份体积乘以样品份数再加上 1 或 2 份以备制备过程中的损失（15μl/反应）：

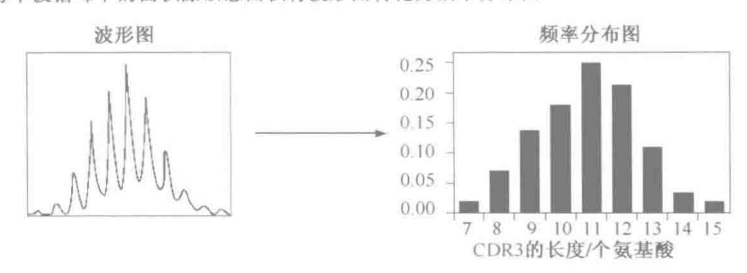
   8.7μl 无菌水
   2.0μl 10×PCR 扩增缓冲液
   3.2μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合液
   1.0μl 4μmol/L 5′端用 6-FAM-标记的 C 基因引物（*HTCB1*-FAM 或 *HTCA1*-FAM）
   0.1μl 5U/μl ，AmpliTaq Gold DNA 聚合酶。

   振荡，瞬时离心，冰上放置。
9. 步骤 7 的 PCR 产物吸取 5μl 到 PCR 管子，加入 15μl 原液（步骤 8）。混匀，室温下瞬时离心反应液溶液。
10. 在带可加热盖的 PCR 仪上进行 run-off 反应，参数如下：

1～3 循环：	2min	95℃	变性
	2min	60℃	复性
	20min	72℃	延伸。

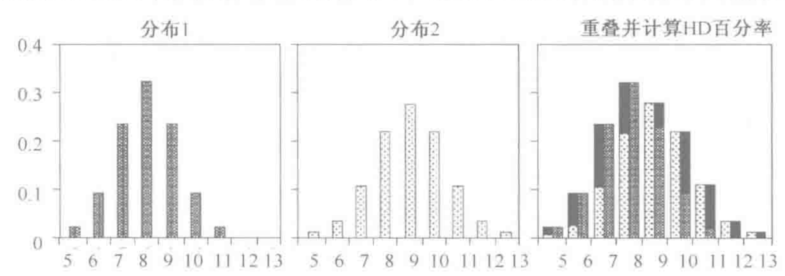
11. 图 14.8.2 分析 run-off 反应产物，配制 4%变性聚丙烯酰胺凝胶，插入 36 道梳子。测序。

1）通过将每个波谱峰下的面积除以总面积将波形图转化为频率分布图



每个 CDR3 波峰下的曲线面积 A_i 对应的是不同的氨基酸长度，用总面积的分数 $S_i A_i$ 表示。

2）选取两幅转化好的频率分布图，比较并计算每一个 CDR3 的不同长度的频率分布，用百分比表示。



每个 CDR3 长度的相差：$D_i = P_i$（分布 1）$- P_i$（分布 2），每幅图的 HD 用公式 HD $= 100 \times [S_i D_{(i)}]/2$ 计算，$[S_i D_{(i)}]$ 是每个 CDR3 长度两幅可能的分布图中绝对间距差的和。

3）V 基因家族的散装分布与哈明距离的百分比比较

图 14.8.2　免疫扫描数据的定量分析。将 GeneScan（或者 ImageQuant）中的数据导出，利用计算机表格程序（如 Microsoft Excel）自动计算哈明距离（Hamming Distance）。

12. 配制上样原液如下（40 孔的量）：
    2.0μl 去离子甲酰胺
    0.5μl GeneScan 泳道标准物 GS-500TAMRA
    0.5μl EDTA/蓝色右旋糖酐上样染液。
13. 准备 36 个 0.6ml 的微离心管，每管加入 3μl 原液和 2μl run-off 产物，振荡，瞬时离心。95℃变性 2min，立即放于冰上。
14. 每孔上样 2～3μl，在 4×凝胶缓冲液中电泳 2.5h（CPI 单元 10.25）。至少等到 400bp marker 分离后，才能获得数据。
15. GeneScan 软件分析数据。根据表 14.8.1～表 14.8.4 的长度计算每个家族的 CDR3 峰值。

备选方案　利用 [^{32}P] dCTP 进行免疫扫描分析

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

20μmol/L 人（表 14.8.1 和表 14.8.2）或者鼠（表 14.8.3 和表 14.8.4）TCR 恒定区（Cgene）引物（*HTCA1* 或 *HTCB1*；－70℃储存）

0.1mCi/μl [α-^{32}P] dCTP（3000Ci/mmol；NEN Life Science Products 或 Amersham Pharmacia Biotech）

6%（m/V）聚丙烯酰胺测序凝胶（CPI 单元 10.25）

√凝胶上样缓冲液

Whatman 3MM 滤纸

PhosphorImager 盒 和 PhosphorImaging Scanner 和 ImageQuant 软件（Molecular-Dynamics）

1. 准备和评估 cDNA 的完整性（见基本方案 1，步骤 1～3）。
2. 在 1.5ml 微离心管中准备两份原液，一份为 TCRAV，另一份为 TCRBV 引物。根据下面的配方乘以样品份数，因为加样过程有损失，要多配 1 或 2 份（17.0μl/反应）。

   10.6μl 无菌水

   2.0μl 10×PCR 扩增缓冲液

   3.2μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合液

   1.0μl 20μmol/L C 基因引物（*HTCA1* 或 *HTCB1* 或小鼠对应引物）

   0.1μl 5U/μl，AmpliTaq Gold DNA 聚合酶

   0.1μl [α-^{32}P] dCTP。

   振荡，瞬时离心，冰上放置保存。
3. 吸取 2μl 模板 cDNA 到 PCR 管，设置阳性、阴性对照。每个 PCR 管加入 17.0μl 原液。然后加入 1.0μl 20μmol/L AV 或者是 BV 引物，用无菌水补到 20μl。振荡，室温下瞬时离心反应溶液。
4. 在可加热盖的 PCR 仪中进行 PCR 反应，参数同基本方案 1，步骤 7。
5. 配制 6%聚丙烯酰胺测序胶，用 square-toothed 代替 sharkstooth 梳子。5.0μl PCR 产物同 5.0μl 上样缓冲液混合，95℃变性 2min，放于冰上。每个泳道上样 5μl 变性产物，60W 恒定功率电泳 3h。

   如果需要确定 CDR3 的精确长度，V 基因家族中已知长度的 CDR3 克隆应当在待测样品的邻近泳道平行跑胶。通过 CDR3 扩增产物特征性的 3bp 间隔得到所测条带长度。
6. 转移凝胶到 Whatman 3MM 滤纸上，在凝胶干燥机中干燥。放射自显影过夜，或者 Phosphor Imager 曝光。ImageQuant 或者其他光密度软件定量每个条带的信号强度。

基本方案 2　链接区引物进行高特异的分光光度分析

材料

4μmol/L 5′端标记（6-FAM）的人或小鼠 BJ 基因反义引物（见本单元最后的表 14.8.5）

PCR 反应产物（见基本方案 1，步骤 7）

1. 在 1.5ml 微离心管中准备原液，因为有 13 个人的 BJ 引物（小鼠 12 个），根据下面的配方乘以 13（小鼠 12），因为加样过程有损失，要多配 1 或 2 份：

   11.7μl 无菌水

   2.0μl 10×PCR 扩增缓冲液

   3.2μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合液

0.1μl 5U/μl ，AmpliTaq DNA 聚合酶

振荡，瞬时离心，冰上放置保存。

2. 准备 13 个反应管，每管加入 2μl PCR 产物和 17μl 原液，再加入 1.0μl 4μmol/L 5′端标记（6-FAM）的 BJ 基因。混匀，并室温下瞬时离心反应溶液，收集管底的溶液。

3. 在带热盖的 PCR 仪上进行 run-off 反应，参数如下：

3～5 循环：	2min	95℃	变性
	2min	60℃	复性
	20min	72℃	延伸。

产物可以立即分析或者 4℃下保存一年。

4. 分析 run-off 反应产物（见基本方案 1，步骤 11～15）。因为 BJ 引物的 run-off 的产物要短于 BC 引物得到的产物，有必要配制高浓度的凝胶，降低电泳时间。

基本方案 3　TCR 基因扩增产物的快速高通量测序

图 14.8.3 为实验步骤。

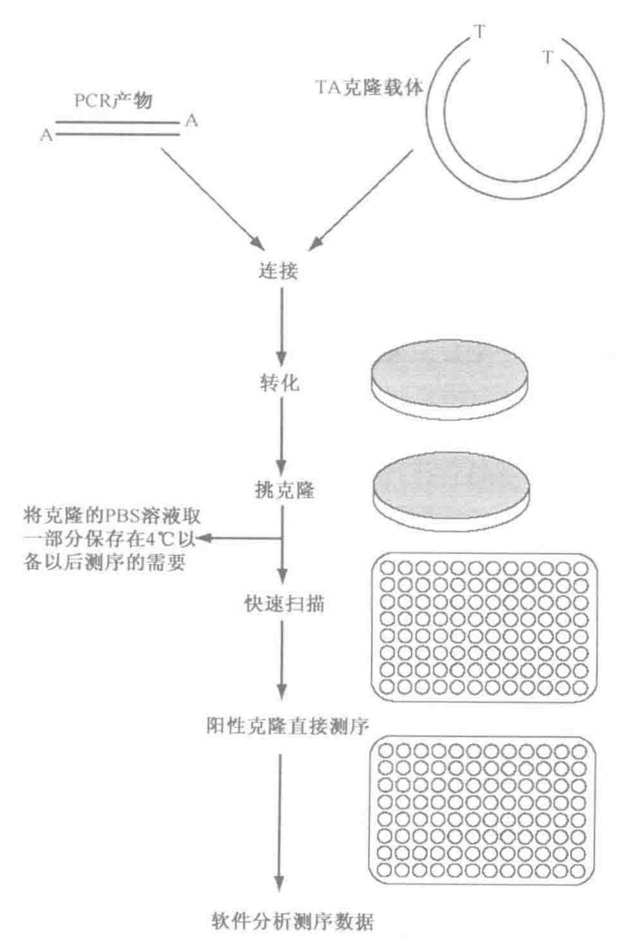


图 14.8.3　TCR 转录物的 PCR 扩增产物的快速筛选和直接测序。

材料（带√项目见附录1）

无菌水，无DNase
10×T4 DNA连接酶缓冲液
2.5ng/μl AMP^r β-gal^+ T-A克隆载体（如Invitrogen pCR 2.1载体或与之相当的载体；见CPMB单元15.7T-A载体的构建）
4U/μl T4 DNA连接酶
PCR产物（见基本方案1，步骤7，新鲜制备）
转化感受态 AMP^s β-gal^- *E. coli* 细菌
√LB琼脂糖平板，含100μg/ml氨苄青霉素，经X-gal处理
√PBS
√蛋白酶K缓冲液
√10×无 $MgCl_2$ PCR缓冲液和15mmol/L $MgCl_2$（如PCR缓冲液Ⅰ，PE Biosystem）
√1.25mmol/L 4dNTP混合液
20μmol/L C基因引物（表14.8.1～表14.8.4）
20μmol/L V基因引物（表14.8.1～表14.8.4）
1.5%（*m/V*）凝胶含0.5μg/ml溴化乙锭，1×TBE配制
1U/μl虾碱性磷酸酶（SAP）
10U/μl *E. coli* 外切核酸酶Ⅰ
10×SAP缓冲液（含酶）
ABI PRISM Dye末端循环测序试剂，AmpliTaq DNA聚合酶FS（PE Biosystem）
75%（*V/V*）异丙醇
1.5ml无菌微量离心管
14℃和37℃水浴
96孔PCR反应矩阵板（如Marsh）
可调热盖的PCR仪（如MJ Research或PE Applied Biosystem）
ABI PRISM型377自动测序仪（如PE Biosystem或similar automated sepuencing machine）
Strip cap或3mol/L Scotch Tape 425-3铝箔胶黏带
带平板套筒的台式离心机（如Beckman GS-6型离心机）

1. 每个TCR V基因PCR扩增产物进行连接反应。在无菌离心管中依次加入下列试剂：
   5μl无菌水
   1μl 10×T4 DNA连接酶缓冲液
   1μl 25ng/μl T-A克隆载体
   1μl 4U/μl T4 DNA连接酶
   2μl PCR产物。

   混匀，14℃孵育至少4h（最好过夜）。

   如果利用商业化的T-A克隆试剂盒（如Invitrogen TA克隆试剂盒），参照说明书进行连接和转化。然后进入步骤4。

连接反应前先电泳 PCR 产物，确保目的条带的存在。一般来说，当 0.5～1.0μl 典型的 PCR 产物（如 300～600bp）与质粒的比例为 1∶1 时，连接效率较高。当然 PCR 产物的用量可以相应的改变，但是，如果超过 3μl，PCR 样品中的盐分会抑制 T4 DNA 连接酶活性。

2. 步骤 1 中连接产物转化到 DH5α 细菌（或与之相当的 AMP^{s} β-gal^{-} *E. coli* 菌株），涂于 LB 琼脂糖平板（平板含 100μg/ml 氨苄青霉素并用 Xgal 处理），37℃培养过夜。
3. 96 孔 PCR 反应矩阵板每孔加入 20μl PBS，挑选阳性克隆（白色），重悬在 PBS 里，每套引物都要有阴性对照。
4. 在第二块 96 孔 PCR 反应矩阵板中，每孔加入 46μl 蛋白酶 K 缓冲液，吸取第一块板子中 4μl PBS/克隆混合物，加入到第二块板子相应的孔中。混匀，56℃ 孵育 50min，95℃，10min。－20℃保存。PBS/克隆 96 孔板密封，4℃保存。
5. 在 1.5ml 微量离心管中，每对引物配制 PCR 反应原液进行筛选。引物和起始 PCR 一样（连接反应）：

   26.8μl 无菌水
   5.0μl 10×PCR 扩增缓冲液
   8.0μl 1.25mmol/L 4dNTP 混合液
   2.5μl 20μmol/L C 基因引物
   2.5μl 20μmol/L V 基因引物
   0.2μl 5U/μl，AmpliTaq DNA 聚合酶。

   颠倒混匀，瞬时离心，冰上放置储存。
6. 吸取步骤 4 中溶液到另一块 96 孔 PCR 反应矩阵板子的相应孔中。每对引物都要设置阴性对照。每孔加入 45μl 原液，混匀（密封盖子，上下颠倒板子），室温瞬时离心反应溶液。
7. 带热盖的 PCR 仪中进行 PCR 扩增，参数如下：

35 循环：	30s	95℃	变性
	30s	60℃	复性
	90s	72℃	延伸
	10min	72℃	延伸。

8. 3～5μl PCR 产物在 1.5%琼脂糖凝胶（1×TBE 配制，含溴化乙锭）上电泳，检测阳性克隆。
9. 在 1.5ml 微离心管，配制 PCR 产物纯化原液，配方如下：

   8.6μl 无菌水
   1U/μl 虾碱性磷酸酶（SAP）
   10U/μl *E. coli* 外切核酸酶 I
   0.5μl 10×SAP 缓冲液。

   混匀，每孔加入 0.8μl 上述液体到用于测序的样品中。
10. 每孔再加入 8μl 用于测序的 PCR 产物到含有 SAP 反应液的孔中，混匀，PCR 仪上 37℃孵育 1h，72℃孵育 15min。4℃短期保存或者－20℃长期保存。

11. 准备另一块 96 孔板测序反应，根据下面配方利用 ABI PRISM Dye 末端循环测序试剂盒，AmpliTaq DNA 聚合酶 FS 配制测序反应液：

    9.0μl 无菌水

    8.0μl Dye 末端反应混合物

    2.0μl PCR/SAP 产物（步骤 11）

    1.0μl 4μmol/L C 基因引物。

    测序反应可用和 PCR 反应一样的引物，或者是嵌套类内引物。

12. 混匀，瞬时离心，立即按如下参数进行测序反应：

    15 循环：　1min　95℃

    　　　　　10s　95℃

    　　　　　5s　50℃

    　　　　　4min　72℃。

13. 每个反应管加入 80μl 75%异丙醇，密封，颠倒混匀，室温放置 40min。板子放在台式离心机中，室温，2000g 离心 45min。弃去上清，将板子倒置在纸巾上，然后将带纸巾的倒置的板放回台式离心机。700g 离心 1min 去除剩余的液体。

14. 在 ABI PRISM 377 或等同的自动测序仪上电泳。分析数据。

表 14.8.5　人和小鼠 TCRBJ 引物[a]

引物	序列[b]	到 CDR3 的距离[b]/bp
人 TCRBJ 引物		
HBJ1.1	FAM-GCTTTCTTTGGACAAGGCACCAGA	18
HBJ1.2	FAM-TACACCTTCGGTTCGGGGACCAGG	18
HBJ1.3	FAM-ATATATTTTGGAGAGGGAAGTTGG	18
HBJ1.4	FAM-CTGTTTTTTGGCAGTGGAACCCAG	18
HBJ1.5	FAM-CAGCATTTTGGTGATGGGACTCGA	18
HBJ1.6[d]	FAM-CTCCACTTTGGGAATGGGACCAGG	18
HBJ2.1	FAM-CAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGG	18
HBJ2.2	FAM-GCTGTTTTTTGGAGAAGGCTCTAG	17
HBJ2.3	FAM-CGCAGTATTTTGGCCCAGGCACCC	16
HBJ2.4	FAM-TTCAGTACTTCGGCGCCGGGACCC	16
HBJ2.5	FAM-CCAGTACTTCGGGCCAGGCACGCG	17
HBJ2.6	FAM-GTCCTGACTTTCGGGGCCGGCAGC	15
HBJ2.7[d]	FAM-AGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCA	16
小鼠 TCRBJ 引物		
MuBJ1.1	FAM-ACTGTGAGTCTGGTTCCTTTACC	29
MuBJ1.2	FAM-AAAGCCTGGTCCCTGAGCCGAAG	25
MuBJ1.3	FAM-CTTCCTTCTCCAAAATAGAGC	17
MuBJ1.4	FAM-GACAGCTTGGTTCCATGACCG	26
MuBJ1.5	FAM-GAGTCCCCTCTCCAAAAAGCG	19

续表

引物	序列[b]	到 CDR3 的距离[b]/bp
小鼠 TCRBJ 引物		
MuBJ1.6	FAM-TCACAGTGAGCCGGGTTCCGAAG	31
MuBJ2.1	FAM-GTGAGTCGTGTTCCTGGTCCGAAG	26
MuBJ2.2	FAM-CCAGCACTGTTCCTGGTCCGAAG	34
MuBJ2.3	FAM-GTTCCTGAGCCAAAATACAGCG	17
MuBJ2.4	FAM-GTGCCCGCACCAAAGTACAAG	17
MuBJ2.5	FAM-GTGCCTGGCCCAAAGTACTGG	17
MuBJ2.7	FAM-CTAAAACCGTGAGCCTGGTGC	34

a. 人源序列信息和引物数据来自 GeneBank 号为 U66061 的 RNA，鼠源序列信息和引物引自 Pannetier 等(1993)。所有引物均为 5′端到 3′端方向。

b. C 区失控引物（run-off primer）应在 5′端用一种能够被自动化测序仪检测到的荧光染料标记。6-FAM 是已被成功应用于许多实例的一种染料，但其他如 HEX、TET、ROX 和 NED 等染料也被使用，建议在使用一种新染料前先查阅仪器说明书。

c. 到 CDR3 的长度从 J 区引物 3′端最后一个碱基开始计算到 CDR3 侧 J 区的第一个碱基。

d. 人 BJ1.6 和 BJ2.6 都有一个只有单个碱基突变的等位基因，用表中引物也能检测出该等位基因。

参考文献：Currier *et al.*，1996；Han *et al.*，1999；Pannetier *et al.*，1995

撰 稿 人：Jefrey R. Currier and Mory Ann Robinson

单元 14.9　多探针核糖核酸酶保护试验同时测定 mRNA 表达

核糖核酸酶保护试验（RPA；图 14.9.1）基于 RNA-RNA 杂交体抵制 RNase A 和 T1 消化这个原理，该实验能够检测微量 RNA（1μg），得到 8～12 个基因的相对表达水平。

基本方案　多探针核糖核酸酶保护试验

材料（带√项目见附录 1）

RiboQuant 体外转录试剂（BD Pharmingen）包含下面：

40U/μl RNasin

GACU 库（2.75mmol/L GTP/2.75mmol/L ATP/ 2.75mmol/L CTP/61μmol/L UTP）

100mmol/L DTT

5×转录缓冲液

20U/μl T7 RNA 聚合酶

1U/μl 无 RNase 的 DNase

20mmol/L EDTA

4mol/L 乙酸铵

√DEPC 水

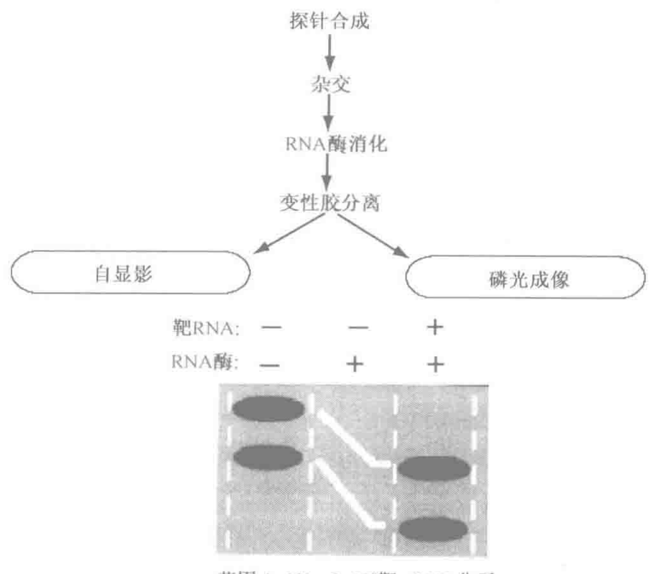


图 14.9.1　多探针核糖核酸酶保护试验步骤。

5～10ng/μl 的 RiboQuant 多探针模板（BD Pharmingen）和（或）常规模板（见辅助方案 1）

3000Ci/mmol [^{33}P] UTP（New England Nuclear）或 [^{32}P] UTP

Amersham MicroSpin G25 柱

Scintillation 液（用于^{33}P 标记的探针）

总 RNA（CPI 单元 10.11）

RPA 试剂盒（BD Pharmingen）包含：

1×杂交缓冲液

2mg/ml 酵母 tRNA

1×RNase 缓冲液

RNase A 和 T1 的混合液（80ng/μl RNase A，250U/μl RNase T1）

1×蛋白酶 K 缓冲液

10mg/ml 蛋白酶 K

4mol/L 乙酸铵

矿物油

RNase 灭活/PPT 试剂 III（Ambion）

100%乙醇

GlycoBlue 共沉淀剂（Ambion）

0.5ml 和 1.5ml 微量离心管，无菌

1.5ml 和 2.2ml 微量离心管

Geiger 计数校准器，用于^{32}P 和（或）^{33}P

液闪小瓶

可调加热块（如 Boekel）

棉签，无菌

1. 在一个无菌微离心管中加入：

   1μl 40U/μl RNasin

   1μl GACU pool

   2μl 100mmol/L DTT

   4μl 5×转录缓冲液

   2μl DEPC 水

   1μl RiboQuant 多探针模板和（或）常规模板（5～10ng）

   8μl 3000Ci/mmol [^{33}P] UTP 或 [^{32}P] UTP

   1μl 20U/μl T7 RNA 聚合酶。

   标记反应时，可以在 BD Pharmingen 多探针模板中加入额外的常规探针，每个探针有 5～10ng 被合成就足够了。

2. 在微量离心管中，轻轻充分混匀，室温下最大速度瞬时离心。37℃孵育 90min。
3. 加入 2μl 1U/μl 的无 RNase 的 DNase 1，轻轻充分混匀。室温下最大速度瞬时离心，37℃孵育 30min。
4. 加入 2μl 的 2mg/ml 的酵母 tRNA 和 22μl 20mmol/L EDTA，吹打混匀。

   酵母 tRNA 可从其他途径购买，但是使用前再次用苯酚/氯仿提取，沉淀后用无 RNase 的水重悬必不可少。

5. 将一根 Amersham MicroSpin G25 的柱子放入 2.2ml 的微量离心管中室温，735*g* 离心 1min，以去柱中缓冲液。将柱子转移到新的 1.5ml 的管子中，加入 44μl 合成反应液，室温，735*g* 离心 2min。

6a. ^{33}P 标记的探针：加入 2ml 闪烁液到一个合适的小瓶中，加入 1μl 洗涤过的探针，在闪烁计数器上确定 cpm。

6b. ^{33}P 标记的探针：加入 1μl 洗涤过的探针到液闪小瓶中，在闪烁计数器上确定 cpm（如 Cerenkov counting）。

   在指定闪烁计数器上，有无闪烁的标记探针的 cpm 比值必须知道，这个比值每 6 个月检查一次。

   另外，2ml 闪液可以加到^{32}P 标记的探针中去。

7. 1～10μg 从单个样品中分离的总靶 RNA 到 0.5ml 微量离心管中。

   如果 RNA 的量是有限的，RNA 可以直接稀释到用于检测每一个探针的 8～10μl 杂交缓冲液中。RNA 可以－70℃保存在杂交缓冲液中。

8. 一个 cocktail，放入 12～14μl 杂交缓冲液到 0.5×10^6～1×10^6 cpm ^{33}P 标记的探针。
9. 加入等体积的杂交缓冲液/探针 cocktail 到每一个 RNA 样品中（步骤 7）。上下吹打 3～5 次混匀。另被两个对照管分别加入探针和杂交液，但不加 RNA 样品。
10. 预热加热装置到 90℃。每个管子中加入一滴矿物油，并将其放入加热装置中。90℃下孵育 5min，然后将加热装置转移到 56℃让样品慢慢冷却，在这个温度下孵育过夜。
11. 37℃下孵育 10～15min。

    如果用 [^{33}P] OTP 标记探针，杂交后的 cocktail 应保存在－70℃过夜，第二

天用 RNA 酶处理。

12. 加入 100μl 1×RNase 缓冲液到对照管，其中含有加入的探针但无样品 RNA。
13. 准备 2.5ml RNase 缓冲液和 6μl RNase A+T1 的混合液。加入 100μl 混合液到每一个杂交反应中，包括另一个对照（步骤 9）。用手指弹匀溶液，不能用涡旋混匀器。室温，2000r/min 离心 30s。30℃下孵育 45min。
14. 当 RNA 样品正被消化时，准备足够的灭活消化液的 cocktail，以如下配方作为指南：

    200μl RNase 灭活/PPT 试剂 III

    50μl 100%乙醇

    5μg 2mg/ml 酵母 tRNA

    1.5μl GycoBlue 共沉淀剂，全部混匀。

    涡旋混匀，加入 250μl cocktail 到 1.5ml 无菌微量离心管中。
15. 移出矿物油下的样品（步骤 13），加入灭活 cocktail，颠倒 3 或 4 次混合均匀，不要用涡旋混匀器，−70℃下孵育样品 15min。

    作为一个灭活/沉淀方法的备选方案，可用蛋白酶 K 灭活 RNase，RNA 也可在无苯酚/氯仿提取下直接沉淀。
16. 室温，14 000r/min 离心样品 15min。小心倒除放射性的上清，用无菌棉签除去管壁过多的液体，小心蓝色沉淀物。
17. 用 3μl 上样缓冲液上下吹打 5～10 次，重悬沉淀物。用凝胶电泳和放射自显影分析（见辅助方案 2）。

    见表 14.9.1。

表 14.9.1　多探针 RPA 分析法的问题解决方案

问题	可能原因	解决方法
模板未被标记	UTP 含有抑制 T7 聚合酶的染料	用无染料的 UTP 重复试验
	T7 聚合酶失效	用新鲜的聚合酶
	模板被降解	获取新的模板
	离心设置和体积不匹配，使被探针标记的位点未被分离出	提高转速再次离心
胶上无被保护条带	RNA 酶没有被适当灭活和移除	检查加入 RNA 酶缓冲液的 RNA 酶的体积和每管中加入灭活/沉淀溶液的体积。如果使用了蛋白酶 K，换用一罐新酶
没有被保护条带，但有 L32 和 GAPDH 带	目的基因少或无表达	增加胶的曝光时间使被保护条带可见
条带出现在和未消化的探针相同的位置	如果条带出现在每条探针相同的位置，说明 RNA 酶没有起作用（图 10.29.6）[a]	RNA 酶重新消化
分析看似有结果，但有很多非保护探针相应的条带	没用 DNA 酶消化或未起作用[b]	用新鲜 DNA 酶重复实验
整张胶分布有许多被保护条带	RNA 被部分降解或 RNA 制备中有 DNA 污染	制备新的 RNA 并用 DNA 酶处理

续表

问题	可能原因	解决方法
胶未聚合	AP 失效	制备新鲜 AP
胶不能轻松从玻璃板上剥下	板不洁净或未经硅化处理	用 2mol/L NaOH 清洁板并硅化或重新硅化(见辅助方案 2)
条带在胶底部不正常迁移	跑胶设备有缓冲液渗漏	检查封闭垫圈
出现与期望保护条带大小不一致的条带	核苷酸多态性导致了目的条带的分裂[c]	从探针提供者处获取 RNA 保护区的序列分析 DNA 的多态性
	污染 DNA 导致被消化探针的残留部分与 DNA 外显子部分杂交	使用前用 DNA 酶处理 RNA,并确定在进行下个操作前将之移除/灭活。或者,用 Trizol 重新提取 RNA,并避免纯化中移去液化层时碰到界面

a. 注意一些被保护条带可能与另一非保护探针条带出现在同一位置。

b. 这可能导致探针与未消化模板杂交，但由于探针过量，也可能发生与 RNA 的杂交。

c. 尽管保护探针中部的单核苷酸多态性很少被 RNA 酶裂解，多态性≥2 个核苷酸可能引起被保护条带的裂解，导致胶上出现较小条带。

辅助方案 1　构建一个核糖探针模板

核糖探针模板（RPT）由 T7 聚合酶先导序列和反义靶 cDNA 构成。核糖探针是由 T7 聚合酶转录来的区域，包括靶 cDNA 和任何载体衍生的序列（图 14.9.2）。只要有可能，靶序列最好能跨越至少两个外显子，以产生一个对 mRNA 特异的探针，但不污染基因组 DNA。区域应该高度保守，尤其是处理不同种系的动物时。只要有一对碱基错配就可以产生未期望得到的长度的保护条带。被扩增产物的长度最好在 100～450bp，以确保全长的转录物和具体条带的分离。确保从多探针模板来的扩增产物有不同的大小，以便实验中的每个探针可以分辨。像 Primer Designer（Science&Educational Software; http://www.sci.ed.com）这样的程序使得这个过程变得很容易。

材料（带√项目见附录 1）

靶 cDNA

SuperScript 一步 RT-PCR 试剂（Invitrogen；可选）

引物：

　感兴趣序列的正向引物（如 Invitrogen，Operon）

　T7 聚合酶引物（如 Invitrogen，Operon）

合适的宿主菌株

√有合适选择性的 LB 平板

Invitrogen Platinum PCR Supermix

DNA ladder（如 DNA 低分子质量 ladder，Invitrogen）

旋转柱（如 GenElute Minus EtBr 旋转柱，Sigma）

5mol/L 乙酸铵，pH5.3，或 3mol/L 乙酸钠，pH5.5

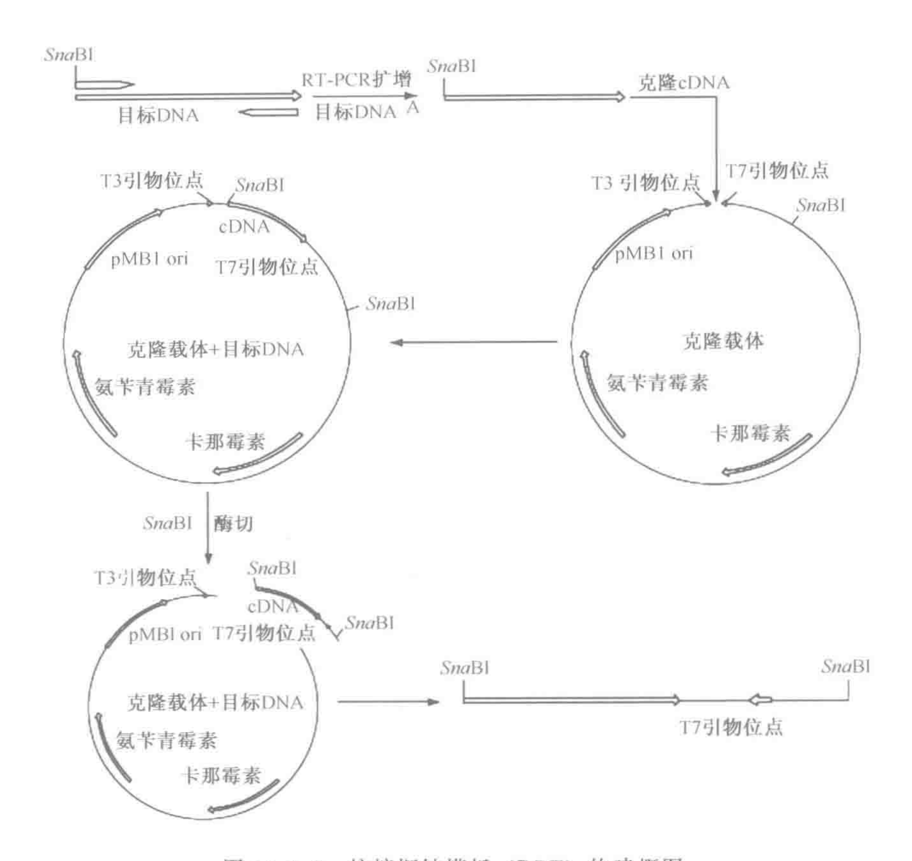


图 14.9.2　核糖探针模板（RPT）构建概图。

100%乙醇

70%（V/V）乙醇，4℃

T7 RNA 聚合酶/RNase 抑制剂 Maxiscript（Ambion）

枪头，无菌

94℃水浴或者加热装置

1. 用传统方法 RT-PCR 扩增靶 cDNA（如单元 14.5 SuperScript 一步 RT-PCR 试剂盒），用感兴趣序列的正义引物和 T7 或 T3 聚合酶引物。

   设计一个特定的探针，如果这个探针要被直接加入到商业化的探针中。

2. 用传统方法克隆扩增靶序列反义引物区，形成一个核糖探针模板（RPT）（如 TA 或者 Zero Blunt TOPO Cloning 试剂盒）和一个合适的载体（如 PCR 4 克隆载体）。转化到适合的宿主菌株（如 CPI 附录 3N），在有合适选择性的 LB 平板上培养。

   选择一个合适的克隆载体时，需要考虑三个因素：①克隆容易；②T7 聚合酶启动子上游的限制性，它将允许 RPT 能够从载体上切割下来；③选择近 T7 转录起始处克隆 cDNA。非 cDNA 序列应配对，以便它们作为探针标记的时候不会重叠。

3. 用无菌枪头挑取一个克隆，轻轻地涂在有合适选择性的 LB 平板上，用于进一步的扩增和克隆质粒的纯化。然后用 20～50μl Invitrogen Platinum PCR Supermix 涡旋洗枪头，94℃孵育 5min 使细菌裂解。

4. 用如下的 PCR 程序扩增：

起始步骤：	5min	94℃	变性
30～35 循环：	30s	94℃	变性
	30s	60℃	复性
	30s	68℃	延伸
最终步骤：	8～10min	68℃	延伸
	无限制	4℃	保持。

5. 10 个以上的克隆，PCR 扩增，并取 10～30μl PCR 反应液分析，DNA 序列分析，校验方向和序列。
6. 用合适的限制酶（如 *Sna*BI）消化含 RPT 的载体，释放 PRT。
7. 在含有 DNA ladder 的琼脂糖凝胶上电泳分离酶切下来的 RPT。切下含有 RPT 的琼脂糖凝胶条带，用旋转柱或相应技术纯化 RPT。

   不要将切下来的胶在 UV 下曝光过长时间。UV 光会导致 DNA 破坏。
8. 加入 1/10 体积的 5mol/L 乙酸铵，pH5.3 或者 3mol/L 乙酸钠，pH5.5 和 2 体积 100%的乙醇。−20℃下孵育 10min。4℃，14 000*g* 离心 10min 并收集沉淀。用足够的 DEPC 处理水重悬溶解含 RPT 的沉淀。55℃下孵育 10min 溶解 DNA。
9. 用一个 CCD 照相机和分析软件定量检测在琼脂糖凝胶上纯化的探针。

辅助方案 2　凝胶电泳和结果的可视化

一个标准的 30 道的 DNA 测序胶可用于分离被保护的探针。利用多探针模板系列时，保护探针的大小可为 100～400 个核苷酸。样品必须加热到 90℃使得 RNA 在上样前变性。电泳之后，胶被烘干，然后在−70℃下曝光到胶片上。

作为一个备选方案来制备测序胶，USB 的 Gel-Mix 6 或者 8 是非常好用于检测 RPA 的胶混合液的商业化的软件。为了使多聚化更快，现配的 10%的过硫酸铵（APS）应该每隔 2～4 周准备一次。为了使胶能够从玻璃板上分离下来，一块玻璃板应该在灌胶前硅化。如果玻璃板保存得很好，并且每做 7～10 块胶后，用 2mol/L 的 NaOH 浸泡 20min，胶灌起来会很容易。灌胶时有一个小的角度也会使灌胶变得容易，新配的胶应该在放平后多聚化至少 20min。

用标准长度的微毛细枪头上样是非常方便的。用上样缓冲液稀释含有未消化探针（如不含 RNase）的第二个对照管，使得每 1μl 含有 50 000～60 000cpm，从而条带密度在一个比较合理的水平上。

RPA 胶应该直接放在胶片上曝光过夜。如果每道用 10μg 总 RNA，要达到可以出版的质量一般需要曝光 4～6h。如果用 ^{33}P，BioMax MS 胶片（VWR）应该放在 TranScreen-LE Intensifying Screen（VWR）里面，后者在盒子里面以加强 ^{33}P 在胶片上的曝光效果。由于这种胶片极度敏感，所以在用该种胶片时暗房里不应该有一点光线，包括电脑检测仪和安全光。另外，如果需要条带定量，胶应该放在磷相仪中过夜，并用合适的系统扫描（如 Molecular Dynamics Typhoon system）。用多探针模板系列，靶基因应该相对 L32 核糖体 RNA 和（或）GAPDH 定量。GAPDH 的水平会根据实验条件而发生变化。

参考文献：Muller *et al.*，2001

撰稿人：Howard A. Young，Jeffrey J. Subleski，and Stephanie M. Krebs

单元 14.10　端粒长度和端粒酶活性的分析

基本方案 1　Southern 杂交检测传统凝胶电泳中末端端粒 DNA 限制性片段（TRF）的端粒长度

材料（带√项目见附录 1）

基因组 DNA（试剂盒分离）
*Hin*fI 和 *Ras*I 限制性内切核酸酶和反应缓冲液
琼脂糖（DNA 级）
√10×TBE 或 TAE
√6×DNA 上样缓冲液
1kb 间隔的 DNA 梯度条带
10mg/ml 溴化乙锭
√变性缓冲液
√TE
√中和溶液
QuickHyb 杂交溶液
γ^{32}P-$(CCCTAA)_4$末端标记端粒探针（见辅助方案 1）
√加入 0.1%（*m*/*V*）SDS 的 5×和 2×SSC
四甲基氯化铵（TMACl）
凝胶电泳设备和电源
紫外光和相机
剃刀片
3MM 纸
塑料膜
干胶仪或相应设备
振荡平板
玻璃杂交管
杂交炉或 43℃水浴
磷光显像系统或相应设备
图像分析软件

1. 按标准步骤从细胞或组织中分离基因组 DNA。
2. 用 *Hin*fI 和 *Ras*I 限制性内切核酸酶各自 10～50U 消化 1～5μg DNA，总体积 50～100μl，37℃孵育至少 4h 或过夜。荧光仪检测消化的 DNA 浓度，或溴化乙锭点测验（见 CPI 附录 3L）。

对大体积的消化反应和（或）高浓度的 DNA 和酶，用苯酚/氯仿/异丙醇 25∶24∶1（$V/V/V$）抽提消化的 DNA 和乙醇沉淀。用 TE 重悬消化的 DNA 至 0.1～0.2μg/μl。

3. 用 1×TBE 或 1×TAE 制备 0.6%琼脂糖胶。每孔加入 1～2μg 每个消化的 DNA 样品和 6×DNA 的上样缓冲混合液。一孔加入 DNA 分子标记（1～40kb）。制备充足的 1×TBE 或 1×TAE 电泳缓冲液（使用与琼脂糖胶相同的缓冲液），含 0.5μg/ml 溴化乙锭。恒压电泳：75V，30min，35V，24～30h 和 75V，1h。
4. 电泳完全后，在紫外线下拍照，拍照时放入尺子比对。
5. 用剃刀片修掉胶的不用区域，将胶放在一片 3MM 纸上，覆盖塑料膜，65℃真空干燥 1～2h。干胶与正面向上的 3MM 纸一起浸泡在 200ml 变性溶液中，室温轻摇 1h。移去溶液和 3MM 纸，100ml TE 洗胶。换成 200ml 中和溶液，摇 30min，重复一次。
6. 将胶放置在一个玻璃管中，用 15～20ml QuikHyb 杂交溶液 43℃预杂交 1h。加 0.5×10^6～1.5×10^6 cpm/pmol γ^{32}P-$(CCCTAA)_4$末端标记端粒探针（见辅助方案 1），45℃旋转过夜。
7. 弃含有未结合的 γ^{32}P-$(CCCTAA)_4$末端标记端粒探针的杂交溶液，25ml 5×SSC/0.1%SDS 简略洗胶。弃 5×SSC/0.1%SDS 并又加入 25ml 5×SSC/0.1%SDS。将管放入杂交炉，40℃旋转 30min。弃 5×SSC/0.1%SDS 并加入 25ml 2×SSC/0.1% SDS 管放入杂交炉中 40℃旋转 30min。弃 2×SSC/0.1%SDS，加入 25ml TMACl 洗液。管放入杂交炉中 44℃旋转 30min。
8. 从玻璃管中小心移出胶，放在纸塔上完全吸去液体，用塑料膜包裹胶，并用磷光屏或胶片曝光。磷光成像仪采集自显影图片，分辨率 50～100μm，或冲洗胶片并用光密度计转换成电子图片。
9. 利用从上样孔的迁移距离对 DNA ladder（2～30kb）作图。
10. 点击分析软件对象工具条上的"line"按钮在目的泳道上画一条线：将光标放置在上样孔上，按住拖动光标到泳道中央，当到达 DNA 分子标记 3kb 处放开鼠标按键。依据分析创建线图。
11. 输出依据直线测量的密度：点击鼠标右键，选择 Copy。打开一个 Excel 表格，粘贴包含每一个从上样孔到 3kb 的相应位置的密度数据。按照 DNA 分子标记迁移将迁移距离（mm）转成 DNA 大小。
12. 按公式计算平均 TRF 长度：

$$\text{平均 TFR(kb)} = \frac{(IO_i)}{(IO_i/S_i)}$$

式中，IO_i 是输出的密度（任意节）；S_i 是在 $i$kb 位置上 TRF DNA 片段的大小。估算平均端粒长度。

备选方案 1　尼龙膜上的 Southern 杂交

附加材料（其他材料见基本方案 1，带√项目见附录 1）

尼龙膜

√碱性转移缓冲液

毛细转移系统

紫外照射或真空炉

1. 从细胞或组织分离基因组DNA，消化DNA，按基本方案1步骤1～4进行凝胶电泳。
2. 用剃刀片修掉不用的胶，置于一个盘中用200ml变性溶液持续轻轻搅拌45min，100ml TE略微清洗，200ml中和溶液持续搅拌30min，两次。将胶浸入碱性转移缓冲液中室温15min，持续轻柔搅拌。
3. 用毛细或其他转移法从琼脂糖胶转移DNA到尼龙膜（最好向下转移）。用紫外照射或在真空炉中烘干将DNA固定在尼龙膜上。接下来的预杂交、杂交和后续步骤按照基本方案1，步骤6～7。
4. 用塑料膜包裹尼龙膜，用磷光屏或胶片曝光。按照基本方案1，步骤8～12。

辅助方案1　端粒或其他寡聚核苷酸末端标记

材料

10pmol/μl $d(TTAGGG)_4$端粒寡聚核苷酸

6000Ci/mmol [γ-^{32}P] ATP

T4噬菌体多聚核苷酸激酶和10×缓冲液

200μl微量离心管

离心柱

液闪仪

1. 将以下试剂在200μl微量离心管中混合：

   1μl 10pmol/μl $d(TTAGGG)_4$端粒寡聚核苷酸

   5μl 6000Ci/mmol [γ-^{32}P] ATP

   2μl 10×T4噬菌体多聚核苷酸激酶缓冲液

   11.4μl蒸馏水

   1μl（10U）T4噬菌体多聚核苷酸激酶

   37℃孵育1h。65℃孵育5min灭活T4噬菌体多聚核苷酸激酶。
2. 离心柱移除未掺入的ATP。
3. 用液闪仪测定特异标记的寡聚核苷酸（使用1μl探针用于分析）。

基本方案2　用脉冲电场凝胶电泳法测量端粒

PFGE被普遍用于测量长的小鼠端粒（25kb到大于50kb），也用于人类端粒的测量。

材料（带√项目见附录1）

淋巴细胞的单细胞悬液

√PBS

√细胞悬浮缓冲液

0.5×TBE 配制 1.2% InCert 琼脂糖，－45℃

√蛋白酶 K 缓冲液

√洗涤缓冲液 I

苯甲基磺酰氟化物（PMSF 溶液，100mmol/L）

缓冲液 A 中溶解 *Hin*fI 和 *Rsa*I 限制性内切核酸酶

0.5×TBE

0.5×TBE 配制 1%超纯琼脂糖

小分子质量 PFG 分子质量标记（嵌入琼脂糖胶中的 194～2kb 分子标记）

溴化乙锭

变性溶液

√TE

中和溶液

QuickHyb 溶液

γ^{32}P-$(CCCTAA)_4$末端标记端粒探针（见辅助方案 1）

√加入 0.1%SDS（*m/V*）的 5×和 2×SSC

1.5ml 微量离心管，去除 DNA 酶

可重复使用的塞子模型

胶带

15ml 管

杂交炉或水浴

平板摇床

脉冲电场凝胶电泳设备

Waterman 3MM 纸

真空干胶仪

杂交管

磷光成像系统

ImageQuant（或相应设备）分析软件

1. 制备淋巴细胞的单细胞悬液，15ml PBS 洗细胞一次，室温，300*g* 离心 7min，计数。
2. 转移 5×10^6～50×10^6个细胞到一个 1.5ml 的微量离心管中，室温，1600*g* 微量离心 2min。弃上清，用 0.5ml 细胞悬浮缓冲液重悬沉淀。充分混合。

   小鼠端粒比较短（≤15kb），如果用相同数目的细胞，端粒探针会产生较弱的信号。
3. 用胶布将塞子模型的底部密封。将等体积的 1.2% InCert 琼脂糖加入细胞悬液中。用移液器充分混合细胞和琼脂糖。用一宽孔枪头转移细胞琼脂糖混合物（约 100μl 液体，0.5×10^6～5×10^6个细胞）到密封好的模型中，4℃冷却 15min。
4. 琼脂糖在塞子模型中凝固后，从底部移去胶带，折断模型的一端，将每个塞子挤出放入一个 15ml 管中。每管加入 5ml 蛋白酶 K 缓冲液，45℃孵育 20h。
5. 去除蛋白酶 K 溶液，加入 5ml 洗涤缓冲液 I，平板摇床上室温轻摇管 15min。重复本步骤一次。

6. 将塞子放入 5ml 新加入 1mmol/L PMSF 的洗涤缓冲液 I 中，37℃孵育 1h 以去除残留的蛋白酶 K（见步骤 5）。将塞子浸没在用水稀释 10 倍的洗涤缓冲液 I 中，4℃储存至使用时。
7. 转移一个琼脂糖塞子到 1.5ml 微量离心管中，将塞子浸没在 400μl 缓冲液 A 中，室温孵育 15min。移去缓冲液 A，加入 250μl 含有 100U *Hin*fI 和 *Rsa*I 的缓冲液 A。37℃孵育 8h 或过夜。移去酶/缓冲液，用 500μl 0.5×TBE 洗塞子以终止消化。

   端粒 DNA 和大多亚端粒 DNA 对这些酶的消化不敏感，但非端粒 DNA 敏感。
8. 用 0.5×TBE 配制 1%琼脂糖凝胶。用与特异脉冲电场电泳系统相合适的胶盒和梳子。胶凝固后，移去梳子，胶中插入一个塞子/孔。在至少一个孔中加入合适的分子质量标记。
9. 将上样胶放入脉冲电场胶盒中，加 0.5×TBE 电泳缓冲液。按照手册推荐的条件溶解端粒，分离 5～100kb 的 DNA。用溴化乙锭染胶，用尺子放在胶旁比对拍照，以方便后续 TRF 长度的测量。
10. 将胶放在一张 3MM 纸上，65℃真空干燥 1～1.5h。用端粒探针与干胶杂交，或用塑料膜包裹，室温储藏。
11. 干胶与正面向上的 3MM 纸一起浸泡在 200ml 变性溶液中，室温轻摇 1h。倒掉溶液，100ml TE 洗胶。将胶浸入 200ml 中和溶液中，室温轻摇 30min。重复用中和溶液孵育一次。
12. 将胶放入有 20ml QuikHyb 溶液的杂交管中，在杂交炉中 50℃旋转 15～30min。在含有预杂交胶的管中加入 0.5×10^6～1.5×10^6 cpm/pmol 末端标记端粒探针（见辅助方案 1），在杂交炉中 50℃旋转至少 5h 或过夜。
13. 弃杂交溶液，用 25ml 5×SSC/0.1%SDS 简略洗胶。弃 5×SSC/0.1%SDS 并又加入 25ml 5×SSC/0.1%SDS。将管放入杂交炉，48℃旋转 30min。弃 5×SSC/0.1%SDS 并加入 25ml 2×SSC/0.1%SDS。管放入杂交炉中 48℃旋转孵育 30min。
14. 从玻璃管中小心移出胶，放在纸塔上完全吸干，用塑料膜包裹胶，并用磷光屏曝光。磷光成像仪采集自显影图片，分辨率 50μm。
15. 既可以用传统胶片也可以用带有 ImageQunt 软件的磷光成像系统来观察端粒并且估计端粒长度分布。

基本方案 3　荧光原位杂交

材料（带√项目见附录 1）

淋巴细胞单细胞悬液
√PBS
√预洗缓冲液
√杂交缓冲液 I
√PNA 端粒探针：(PNA) FITC-$(CCCTAA)_4$
√洗涤缓冲液 II
√洗涤缓冲液 III

√重悬浮缓冲液

低密度 FITC 偶联的 24 号标准微珠（Bangs Laboratories）

任意 DNA 染料（Exciton 公司的 LDS751；Sigma 公司的 propidium iodide）

去 DNase 的 1.5ml 离心管

加热器，加热块或者水浴锅

12mm×75mm 的流式管

Nitex 尼龙网

流式细胞仪

分析软件（CellQuest 或者其他）

1. 制备淋巴细胞的单细胞悬液，用 15ml PBS 洗一遍，室温，300g 离心 7min，然后细胞计数（附录 3A）。取 1×10^6 个细胞来确定 FSC 和 SSC 选择框。
2. 可选：为了控制每天实验杂交效率的变化，需要包括一群对照细胞，并且在每一次实验中细胞要保持固定不变的端粒长度（如培养的 EL-4、K652 等肿瘤细胞或者 Daudi 或者淋巴细胞如外周淋巴细胞应来自同一个供体）。用 PBS 洗一遍然后计数（附录 3A）。
3. 将剩下的细胞室温，300g 离心 7min，弃去上清。用 1～2ml 预洗缓冲液重悬浮细胞沉淀，室温至少孵育 30min。
4. 每一个样本将最多 3×10^5 个细胞转移到至少 4 管新的离心管中。1600g 瞬时离心沉淀细胞，吸去上清然后温和振荡重悬浮细胞。在两管离心管中加入 300μl 含有 FITC 偶联的端粒探针的杂交缓存液 I，往剩余管中加入 300μl 不含探针的杂交缓冲液 I（自发荧光对照）。所有管子室温避光孵育 15min，将管子放入加热器 86℃避光孵育 15min。
5. 从加热器中取出后将管子室温避光继续孵育 60～90min。
6. 1600g 离心 5min 洗去未结合探针，倒掉或者用吸引器吸去多余上清，只保留大约 100μl 液体。用手轻弹离心管重悬浮细胞（不要用振荡器），加入 1ml 洗涤缓冲液 II，用洗涤缓冲液 II 重复洗 4 遍。
7. 洗后吸去上清，只保留 50μl 液体，轻弹离心管重悬浮细胞。加入 1ml 洗涤缓冲液 III 温和颠倒管子 1 或 2 次悬浮细胞，950g 离心 5min。
8. 洗后吸去上清，只保留 50μl 液体。用 250μl 重悬浮缓冲液，有需要的可以将细胞悬液通过 Nitex 尼龙网滤去较大的细胞团块，然后将细胞悬液转移到 12mm×75mm 流式管中。至少室温避光放置 20min，48h 内上机分析。

   虽然很多实验室都有现成的 PI 染料，但在本实验方案中由于 PI 可与 FITC 偶联的端粒相互干扰，所以 LDS751 更适合用来做 DNA 染色。不过，用亚饱和浓度的 PI，并且如果每管都有相同数量的细胞，则可以最低限度的降低这个问题。

9. 得到的数据，可用线性分析处理 FSC、SSC 和 FL3（LDS751 或者 PI），而 FL1（FITC 偶联的端粒）既可用线性分析也可用对数分析。

   线性分析相对于对数分析对于不同细胞群之间微小的荧光强度的差异敏感性更高。

10. 可选：使用低密度 FITC 偶联的 24 号标准微珠来设置 FL1 通道标准化得到的数据。

调整电压和幅度是得到的数据有线性设置，未标记微珠和 4 个 FL1 通道中检测到的 FITC 标记微珠的荧光强度峰值与通道数目一致。记录得到的电压和幅度，保存文件。接下来的实验，调整 FL1 的电压和幅度使得 4 个 FITC 标记微珠群的峰值通道数目在每一次实验中都是相同的。

11. 用一管活细胞在 FSC 和 SSC 通道中标记活细胞群体，保存对照组样本数据。用 24 号微珠作为最后的样品来确认流式仪没有发生偏移。
12. 用 CellQuest 或者其他软件来分析流式数据。通过在 FSC 和 SSC 通道来分选端粒特异性标记的细胞，并通过 FSC 和 LDS751/PI 通道来分选单个非分裂细胞来进行分析，画柱状图并且算出平均通道数目。用以下方法来计算每种样本的端粒特异性标记数目。
    a. 直接从平均 FL1 通道数目来计算端粒特异性标记：端粒特异性标记$_{\text{通道数目}}$＝端粒探针标记数$_{\text{通道数目}}$－自发荧光数$_{\text{通道数目}}$。用检测每天探针杂交效率的对照细胞的标记数对得到的数据进行标准化。
    b. 用 Bangs Laboratories 提供的软件画出每群 FITC 标记微珠记录的平均通道数和每群微珠特异 MESF 值之间的曲线关系。用线性回归法从该曲线上的 FL1 通道数推算出每个样品管子的 MESF。计算端粒特异性标记数（用 MESF 单位）：端粒特异性标记$_{MESF}$＝端粒探针标记$_{MESF}$－自发荧光数$_{MESF}$。

FISH 实验中出现的常见问题见表 14.10.1。

表 14.10.1　FISH 分析的问题解决方法

问题	可能原因及解决方法
FLOW-FISH	
较差的复制重复性	杂交缓冲液没有完全混匀
得到用于分析的细胞太少	由于细胞比较脆弱，处理的时候需要小心仔细
每次不同的杂交效率	用 FITC 标记的微珠和对照细胞群来进行标准化
Q-FISH	
没有分裂中期涂片或者涂片质量较差	调整最适条件——秋水仙素处理不同时间
较差的杂交重复性	杂交缓冲液没有完全混匀
每次不同的杂交效率	用 Cy3 标记的微珠和对照分裂中期涂片标准化

基本方案 4　Q FISH

材料（带√项目见附录 1）

分裂中期涂片（见辅助方案 2）
√PBS，pH7.5
√4%（V/V）甲醛
√胃蛋白酶，37℃
70%，90%，100%（V/V）乙醇
√PNA 端粒探针：（PNA）Cy3-$(CCCTAA)_3$
√杂交缓冲液 II

√洗涤缓冲液 IV

√TBST 缓冲液

TetraSpeck 荧光标记中心体样品试剂盒（分子探针），选用

√DAPI-Vectashield 染料

20mm×50mm 盖玻片

玻璃染色盘

摇床

用铝箔纸包被的湿润的载玻片

用来存放载玻片的卡纸板夹

荧光显微镜

注：下列所有实验步骤除了胃蛋白酶处理以外，其余均在室温的摇床上进行。所有的洗涤步骤都是把载玻片放在玻璃染色盘中然后加入足够量的洗液覆盖载玻片。在载玻片暴露在探针中后应用铝箔纸包裹染色盘避光保护。

1. 在玻璃载玻片上用分裂细胞制作分裂中期涂片（见辅助方案 2）。如果涂片已经开始脱水，重新用 PBS 洗载玻片 5～15min。将涂片用 4%甲醛固定 2min。
2. PBS 洗载玻片 3 次，每次 5min。
3. 用胃蛋白酶 37℃处理载玻片 10min 以消化蛋白质，PBS 洗 2 次，每次 5min。
4. 4%甲醛固定玻片 2min，PBS 洗 3 次，每次 5min。
5. 脱水：用 70%乙醇处理 5min，然后 90%乙醇处理 5min，最后用无水乙醇处理 5min，短暂的风干玻片。
6. 滴 30μl 含端粒探针的杂交缓冲液 II 到一个 24mm×50mm 的盖玻片上。
7. 将玻片 80℃右侧向上孵育 3min 使端粒变性并且与探针杂交，玻片平放然后右侧向上放入湿润的玻片盒中，用铝箔纸包裹避光，室温孵育 2h。
8. 用洗涤缓冲液 IV 洗 2 次，每次 15min。然后用 TBST 缓冲液洗 3 次，每次 5min。
9. 脱水：用 70%乙醇处理 5min，然后 90%乙醇处理 5min，最后用无水乙醇处理 5min，短暂的风干玻片。
10. 可选：通过荧光标记珠子标准化各个实验之间的荧光信号。将 2～5μl TetraSpeck 珠子（0.5μm）以 1∶50 比例稀释于无水乙醇中，然后涂在不含分裂中期涂片的玻片上，使珠子在玻片上干燥。滴 40μl DAPI-Vectashiedl 染剂到一块 24mm×50mm 盖玻片上，将载玻片从上往下放到杂交缓冲液 II 的液滴上，然后将盖有盖玻片的载玻片翻过来。玻片平放在载玻片保存盒中 4℃避光。
11. 用配备有广泛视野的荧光成像显微镜获取 DAPI 和 Cy3 的图像。
12. 获取图像并且保存原始数据为 16 位 TIFF 格式文件，因为 TFL-TELO 端粒分析软件只接受 8 位数据文件，连续扫描 16 位原始文件然后输出并保存为 8 位 TIFF 文件用来分析，特别是 Cy3 端粒图像。
13. 用 TFL-TELO 端粒分析软件定量 Cy3 端粒标记。

辅助方案 2　从分裂的淋巴细胞中制备分裂中期染色体

材料

淋巴细胞
促有丝分裂刺激剂
10μg/ml 秋水仙素
0.075mol/l KCl，37℃
3∶1（V/V）甲醇/乙酸，新鲜配制
70%，90% 和 100%（V/V）乙醇
50ml 和 15ml 离心管
离心机
振荡器
Parafilm 封口膜
25mm×75mm×1mm 载玻片

1. 培养的淋巴细胞用丝裂原刺激 48h，诱导其增殖（见第二章单元 2.7 B 细胞刺激和第二章单元 2.11 T 细胞刺激）
2. 加入 10μg/ml 秋水仙素（终浓度为 0.1μg/ml）至培养基中，37℃培养 30min～3h。将细胞转移入 50ml 离心管，室温，300g 离心 7min。吸掉大部分培养基，留 5ml。剧烈的反复吹吸或涡旋振荡，使细胞完全悬浮。
3. 边逐滴加入 10ml 0.075mol/L KCl，边轻微的涡旋振荡。用 KCl 装满离心管，37℃孵育 1h。加入 3～5 滴 3∶1（V/V）甲醇/乙酸（液体会变成黄色），颠倒混匀。室温，300g 离心 10min。吸掉大部分培养基，留 5ml。手指用力弹管壁，悬浮细胞。用 3∶1（V/V）甲醇/乙酸装满离心管，室温，300g 离心 10min。
4. 将细胞转移进 15ml 离心管。用 3∶1（V/V）甲醇/乙酸装满离心管，室温，300g 离心 10min。吸掉大部分培养基，留 1ml。手指用力弹管壁，悬浮细胞。用 3∶1（V/V）甲醇/乙酸装满离心管，室温，300g 离心 10min。重复两次。
5. 洗完最后一遍后，用小体积的 3∶1（V/V）甲醇/乙酸悬浮细胞。如果不做涂片，则用封口膜将离心管封闭，于－20℃可保存 6 个月。保存于－20℃的细胞用 3∶1（V/V）甲醇/乙酸洗一遍后可进入下一步。
6. 将 25mm×75mm×1mm 的载玻片 45°角放置。滴加 15μl 的细胞悬浮液于载玻片上。待液体蒸发完后，在显微镜下观察有丝分裂中间期。必要时可调整 3∶1 甲醇/乙酸的体积（实验成功的关键在于环境的温度和湿度）。
7. 脱水：70% 乙醇 5min，90% 乙醇 5min，100% 乙醇 5min。涂片室温保存。

基本方案 5　端粒酶活性的测定

在淋巴细胞的发育和活化中，端粒酶的活性受到严密的调控。

材料（带√项目见附录 1）

细胞

√PBS

√冰冷的洗脱缓冲液 V

√冰冷的细胞裂解液

√DEPC 处理过的水

√10×端粒酶反应缓冲液

20mmol/L dATP、dGTP 和 dTTP 混合液

√引物，用于端粒酶合成

5U/μl *Taq* 聚合酶 和 10×反应缓冲液

1mmol/L dNTP

抗 *Taq* 的抗体（TaqStart，Clontech）或热启动 *Taq* 聚合酶

寡核苷酸引物（ATCGCTTCTCGGCCTTTT）

TSNT（DNA 模板：AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT）

√6× DNA 上样缓冲液

12% 非变性聚丙烯酰胺胶

√10×TBE 或 TAE 缓冲液

匀浆器

PCR 仪

聚丙烯酰胺胶电泳槽

干胶器

磷光成像系统（Typhoon 或 Storm）或同等仪器

分析软件（Image Quant 或其他类似软件）

1. 于 1.5ml 离心管中用 1ml PBS 悬浮 1×10^6 个细胞。4℃，8000*g* 离心 5min。用 20～100μl 冰冷的洗脱缓冲液 V 悬浮细胞，继续离心。
2. 用 20～100μl 冰冷的细胞裂解液悬浮 1×10^6 个细胞或 1μg 蛋白质。冰浴 30min，12 000*g*离心 30min。对于组织，可切成合适大小后，置于细胞裂解液中用匀浆器匀浆。
3. 将上清小心转入干净和预冷的 1.5ml 离心管中。取 10μl 用来测定端粒酶活性，其余的上清可置于－80℃保存 6 个月到一年。
4. 在 0.5ml 离心管（或 0.2ml PCR 管）中，加入 5μl 细胞裂解物，2.5μl DEPC 处理过的水，2.5μl 端粒酶反应缓冲液（1μl 10×端粒酶反应缓冲液，各 1μl 20mmol/L dATP、dGTP 和 dTTP，0.5μl 引物），于 22℃孵育 60min 或 30℃孵育 30min。取 2μl 端粒酶合成产物用于 PCR 扩增，其余的可于－20℃保存 2 周。
5. 为了定量端粒酶活性，需设置以下对照：①热变性的样品，将细胞裂解液置于 85℃孵育 10min 以灭活端粒酶；②阳性对照：具有端粒酶活性的细胞裂解物（如肿瘤细胞 293）；③阴性对照：仅细胞裂解液。
6. 末端标记的端粒酶扩增引物（见辅助方案 1）。
7. 在 2μl 端粒酶合成产物及对照中，加入共 18μl 的下列试剂：

   2μl 10×DNA *Taq* 聚合酶反应缓冲液

   2μl 1mmol/L dNTP

0.5μl [γ-^{32}P] 标记的端粒酶扩增引物
0.2μl 20μmol/L ACX 引物
0.2μl DNA *Taq* 聚合酶
0.2μl 抗 *Taq* 的抗体或热启动 *Taq* 聚合酶
0.2μl 20μmol/L 寡核苷酸
1μl 1～10amol/μl TSNT
11.7μl DEPC 处理过的水。

在 PCR 反应过程中，Ts 和 NT 作为扩增 TSNT DNA 的引物而 TSNT 作为模板。此处的 TSNT DNA 作为 PCR 扩增反应和后续定量的内部参照。由于 TSNT 能够和 Ts 引物竞争从而影响端粒扩增产物，所以必须通过检测由不同端粒末端转移酶活性得到的端粒扩增产物来调整加入的 TSNT 的量。使用已知数量的 DNA（0.1 amol）和一种特殊模板（R8）可以定量检测产生的端粒扩增产物，以此来反应端粒末端转移酶活性（步骤 11，可选）。

8. 混匀，用下列程序作 PCR：

起始循环	94℃ 30s
28～32 个循环	94℃ 20s
	60℃ 30s。

扩增好的 DNA 立即电泳。

9. 加入 4μl 6×DNA 上样缓冲液于每个样品中，混匀，取 8μl 加入 12%非变性聚丙烯酰胺胶的上样孔中，200V 电泳约 1.5h。当第二种染料 xylene cyanol 电泳至胶底部时，终止电泳。真空中 65℃，30min 干胶。胶片曝光或感光屏感光。

10. 获取图像。

通过磷光成像仪（用 100μm 或者更高分辨率）得到凝胶图像，或者通过光密度计得到成像的胶片。

一个成功的 TRAP 测试中，所有样本都有一条 36bp 的条带相当于内部参照。此外，阳性对照和定量对照中还有一条从 50bp 开始的以 6bp 为递增幅度的 DNA 产物梯状条带，而阴性对照和热处理样本没有≥50bp 的 DNA 产物梯状条带。

11. 测量对照条带及端粒酶产物条带的灰度，用相对于阴性对照的相对比值或总的端粒酶产生值（telomerase product generacted，TPG）来表示结果。公式如下：

$$\mathrm{TPG}=\frac{I_x-I_0/\mathrm{IC}_x}{(C_\mathrm{R}-C_0)/\mathrm{IC}_\mathrm{R}}\times 100$$

式中，I_x 代表样品 x 所有条带的总信号强度；I_0 代表热灭活样品的总信号强度；IC_x 代表样品 x 的内参信号强度；C_R 代表 R8 的信号强度；C_0 代表阴性对照的信号强度；IC_R 代表 R8 内参的信号强度。

为了比较不同样本，端粒产物和内参待测信号强度的面积大小应该在所有样本中是相同的。Ts 引物在扩增内参 DNA 和合成的端粒重复序列的扩增中的竞争性可以通过扩增的内参条带的抑制来定量端料产物，通过与已知定量的 R8DNA 产物相比较，可以定性和定量地分析细胞或组织样本中端粒酶的活性。

实验常见问题见表 14.10.2。

表 14.10.2　TRAP 分析的常见问题的可能原因及解决方法

问题	原因和解决方法
端粒酶活性产物(TRAP)在包括无样品的泳道中都存在	PCR 试剂的问题——更换新的试剂
TRAP 和内参带在阳性对照中有但样品中没有或很少	裂解物中含有 *Taq* DNA 聚合酶的抑制剂——用裂解缓冲液稀释检测样品以稀释抑制剂
鼠端粒酶样品的活性很弱	本方法测定鼠端粒酶样品的活性不如人的样品敏感——可使用 Intergen 公司的 TRAPeze 试剂盒
内参和样品端粒酶产物之间的竞争是非线性的	优化 TSNT 的使用浓度

备选方案 2　非放射性的 TRAP 分析方法 1：荧光染料（SYBR I）标记

附加材料（其他材料见基本方案 5）

SYBR I（Molecular Probes）
小盘子
平板摇床
荧光成像系统

1. 按照基本方案 5 中的步骤 1～5 操作。
2. 将基本方案 5 中步骤 7 的 PCR 体系稍作更改，使用 0.2μl 的未标记的端粒酶合成引物（20μmol/L）。
3. 按照基本实验方案 5 中的步骤 8～9 操作。
4. 将胶置于装有 1×SYBR I DNA 染料的小盘子中，室温于摇床上孵育 5min。
5. 用 Typhoon 等荧光成像系统采集图像（激发光/发射光波长分别为 497nm 和 520nm）。
6. 按照基本方案 5 中的步骤 11 进行数据分析。

备选方案 3　非放射性的 TRAP 分析方法 2：荧光染料（TAMRA-TS）标记

附加材料（其他材料见基本方案 5）

TAMRA 标记的端粒酶合成寡核苷酸
6×DNA 上样缓冲液（无染料）
滤光片（580 BP Cy3 TAMRA）

1. 按照基本方案 5 中的步骤 1～5 操作。
2. 将基本方案 5 中步骤 7 的 PCR 体系稍作更改，使用 0.2μl 的 TAMRA 标记的端粒酶合成寡核苷酸（20μmol/L）。
3. 用基本方案 5 步骤 8 相同的 PCR 参数。
4. 调整基本方案 5 步骤 9，加 4μl 修饰过的 6×DNA 上样缓冲液，跑胶。在平行孔中加入常规量的 DNA 上样缓冲液以确定电泳时间，其余按照基本方案 5 步骤 9 的电泳步骤进行。

5. 用 580 BP Cy3 TAMRA 发射滤光器得到 100μm 分辨率的原始图像。

6. 根据基本方案 5 步骤 11 的指导进行数据分析。

参考文献：Kim and Wu，1997

撰 稿 人：Karen S. Hathcock，Richard J. Hodes，and Nan-Ping Weng

［王晓健（第十四章）］

第十五章　免疫分子与受体工程学

制备特异性抗体的方法已经发生了翻天覆地的变化，从经典的远系繁殖动物免疫，如家兔等物种获得异质性抗血清（单元 1.2），以及利用遗传手段使用诸如小鼠等近交系动物，到单克隆抗体技术这一革命性的进展（单元 1.3）。这些技术有一个局限性，即初始的免疫原与免疫动物所耐受的抗原在结构上必须是截然不同的。因此，对某些表达为免疫动物自身分子的特定抗原很难产生高滴度的抗血清或高亲和力的单克隆抗体。克服这一困难的成功策略包括：使用与免疫抗原在遗传上不同的动物、使用不同于抗原来源种属的动物进行免疫，以及近年来使用的分子工程手段，这些分子工程技术可以产生、筛选并鉴定某些在自然情况下不会产生的抗体。其中噬菌体抗体展示技术显得最为成功。使用这些方法，无论是原始的广谱胚系抗体库的重链可变区（variable heavy，V_H）和轻链可变区（variable light，V_L），还是已知单克隆抗体的特定配对的 $V_H V_L$ 经过随机或定点突变而产生限制性抗体库都可以表达为一个文库，并以融合蛋白的形式展示在适当的噬菌体外壳蛋白上。超过 10^8 的特异性可以展示在噬菌体表面，再通过仔细的筛选和克隆，单个的高亲和力抗体结合位点就可以被鉴定出来并进行扩增。

单元 15.1 介绍了一种制备可溶性 MHC-Ig 二聚体的方法。在此之前，由于缺乏这类高亲和力的制剂，要区分不同抗原特异性的 T 细胞是很困难的。尤其是可溶性的单价 MHC 复合物与其对应的 T 细胞受体（T cell receptor，TCR）的固有亲和力较低，因此在定量测定抗原特异性 T 细胞方面没什么用处。用这一新颖的分子设计方法，可以制备高亲和力的 TCR 结合制剂并可用来对抗原特异性 T 细胞染色，并通过流式细胞术来进行分析，该单元还包括 MHC-Ig 双聚体与肽结合的一些说明及流式分析抗原特异性 T 细胞的辅助说明。

最后，单元 15.2 介绍了一种制备多聚体 MHC-I/肽复合物的方法，用细菌表达并在体外重新折叠的 MHC-I 重链，β2-微球蛋白及合成的抗原肽，通过酶作用进行生物素化并与链亲和素结合而实现多聚体化。这些 TCR 特异的四聚体可用流式细胞分析来检测抗原特异性 T 细胞。正是由于发展了表达 MHC-I 类分子并在体外与合成肽进行重新折叠的有效方法，以及鉴定出了用酶进行生物素化的底物特异蛋白质序列，才使得这一直接用于生产合成的 TCR 配体的方法的产生，并使其成为四价以增加亲和力（尽管 TCR 与其 MHC/肽配体固有亲和力较低），以及通过带有荧光标签如荧光素和藻红蛋白的链亲和素来对四聚体进行标记。MHC/肽四聚体在检测外周血、淋巴组织或组织培养中特异性 T 细胞时非常有用。除了用于 T 细胞，还可以用于某些 NK 细胞的检测，这些 NK 细胞具有针对特定 MHC-I 类分子的受体，还可以用于鉴定阳性细胞，并进行制备性分选，甚至在体外对这些细胞进行刺激。单元 15.2 包括了设计策略部分并详细描述了 MHC-I/肽四聚体的制备、评价及使用。

撰 稿 人：David Margulies

单元 15.1　用 MHC-Ig 二聚体检测抗原特异性 T 细胞

策略设计

可溶性二价 MHC-Ig 融合蛋白是通过将编码 MHC I 类分子胞外区的 cDNA 插入免疫球蛋白重链基因 5′端而表达产生的。在编码 MHC I 类分子胞外区的 cDNA 片段的 5′端和 3′端加上限制性内切核酸酶位点就可以将其以正确的可读框架直接克隆到编码一个完整的且重排过的基因组 IgG1 基因质粒上（pXIg；图 15.1.1A）。编码 MHC-Ig 融合蛋白的质粒可以在鼠浆细胞系 J558L 细胞中进行表达。因为这些细胞只产生内源性的 λ 轻链而不产生内源性的重链，因此产生的唯一 Ig 样蛋白将是二价的 MHC-Ig 融合蛋白。如果用人基因组 $β_2$ 微球蛋白基因共转染 J558L 细胞，MHC-Ig 蛋白的表达将显著增加，共转染细胞通常可以表达 1～20mg/L 的 MHC-Ig 蛋白。

基本方案　构建 MHC I-Ig 二聚体

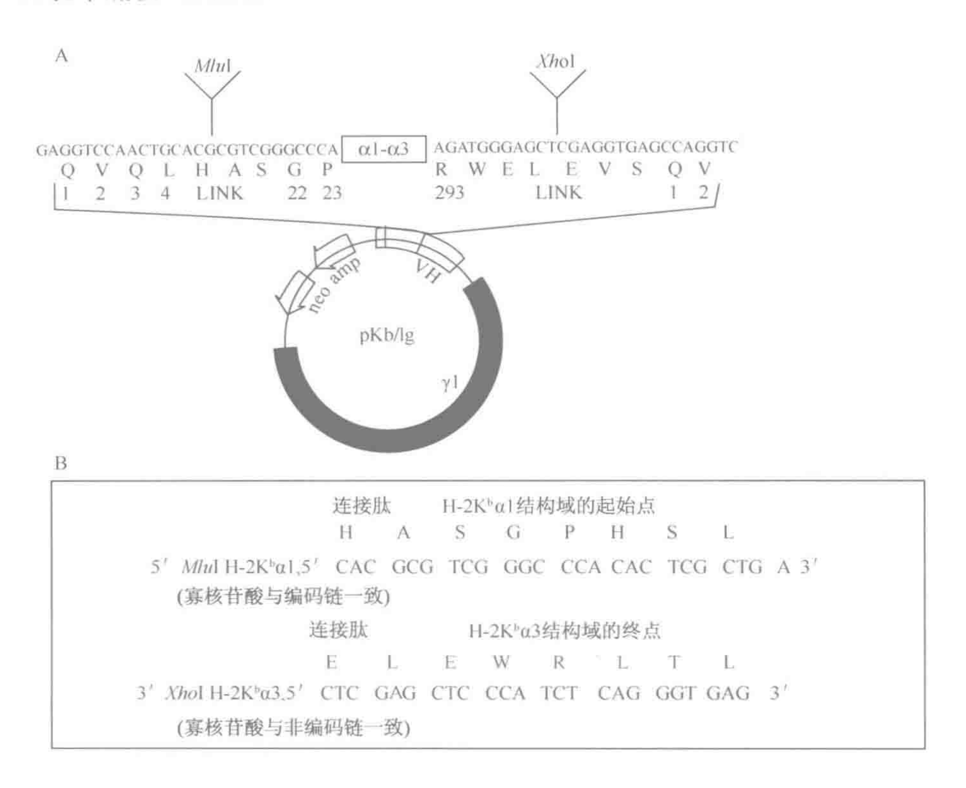
pXIg 在 *Mlu*I 位点的 5′端含有一个编码信号肽的序列，因此 I 类分子的 cDNA 无需含有其他信号序列。

材料（带√项目见附录 1）

编码目的 MHC I 类分子的 cDNA 及合适的引物
*Mlu*I 和 *Xho*I 限制性内切核酸酶及缓冲液（New England Biolabs）
TA 克隆试剂盒（Invitrogen），可选
pXIg 质粒（可向作者索取）
10×T4 DNA 连接酶缓冲液，添加 5mmol/L ATP
1 Weiss 单位/μl 的 T4 DNA 连接酶（Life Technologies）
√LB 平板，含 50μg/ml 氨苄青霉素和 30μg/ml 卡那霉素
√LB 培养基，含 50μg/ml 氨苄青霉素
*Pvu*I 限制性内切核酸酶及缓冲液
含有人类基因组 $β_2$ 微球蛋白基因的质粒（可向作者索取）
√3mol/L 乙酸钠，pH5.2
100%乙醇
J558L 细胞（可向作者索取）
√RPMI-10 完全培养基，含 10mmol/L HEPES（完全 RPMI-10/HEPES）
10mg/ml G418（Life Technologies）
14℃水浴
微量离心机，4℃
$25cm^2$ 培养瓶
Bio-Rad Gene Pulser（或与其相当的电穿孔仪）及用于真核细胞的 0.4cm 间隙的电

转杯

96孔平底板（Falcon）



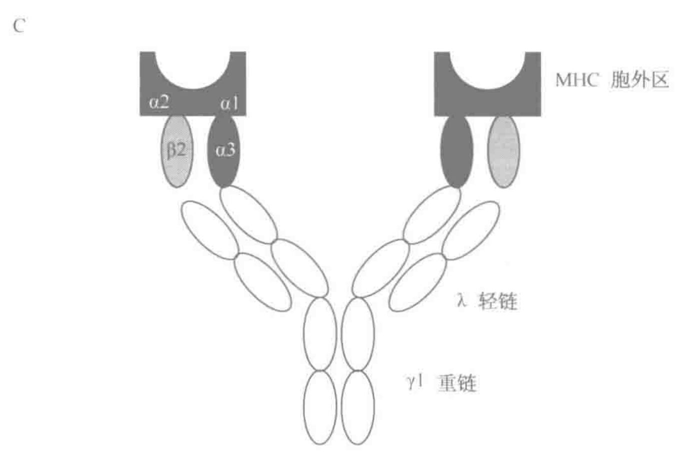


图 15.1.1　二价的 MHC-IgG 嵌合分子的构建及其构型。A. pXIg 质粒示意图，MHC I类分子胞外区的编码序列处于 IgG1 基因重链可变区之中。B. 用来向鼠 H-2K^b cDNA分子引入适当的限制性内切核酸酶位点（*Mlu* I 和 *Xho*I）的核苷酸序列。C. H-2K^b/IgG 分子结构模型示意图。

1. 用100μl反应体积，PCR扩增编码目的MHC I类分子的cDNA并引入所需的限制性内切核酸酶位点。用含有*Mlu*I位点的5′引物和含有*Xho*I位点的3′引物，并使其与

MHC 分子 $\alpha 3$ 结构域末端的可读框架对应（如图 15.1.1）。

2. 取 10μl 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳以检测 PCR 扩增是否成功（CPI 单元 10.4）。
3. 用酚/氯仿抽提、乙醇沉淀来纯化扩增的 MHC I 片段。
4. 用 *Mlu*I 和 *Xho*I（CPI 单元 10.8）酶切 PCR 扩增所得的 MHC I 基因，进行琼脂糖凝胶电泳，用电洗脱法从胶上分离所需要的片段（CPI 单元 10.5）。或者，用 TA 克隆试剂盒直接克隆 PCR 产物并对插入片段测序。
5. 用 *Mlu*I 和 *Xho*I 酶切 pXIg 质粒并按照步骤 4 纯化 10～12kb 大小的载体片段。将酶切并且纯化好的 PCR 片段及 pXIg 载体片段进行琼脂糖凝胶电泳以进行 DNA 定量。
6. 用纯化的片段设置如下连接反应（插入片段/载体片段的摩尔比为 10∶1），用水将总体积补至 10μl，14℃水浴过夜。

    50ng pXIg 载体片段
    50ng MHC 片段
    1μl 10×T4DNA 连接缓冲液（含 5mmol/L ATP）
    1μl 1U/μl T4DNA 连接酶。

7. 用电穿孔法转化 *E. coli* 感受态细胞（CPI 单元 10.15），50μl 感受态细胞用 1～2μl 连接产物。将转化的细菌涂布于含有 50μg/ml 氨苄青霉素和 30μg/ml 卡那霉素的 LB 平板，37℃孵育过夜。
8. 从平板上挑取克隆，将单一克隆转移至 5ml 含有 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中，37℃振摇培养过夜。用碱裂解法提取质粒 DNA（小量制备，CPI 单元 10.3）。
9. 用限制酶作图来筛选所需的插入片段存在与否，如果还没有进行过测序（步骤 4），则对含有插入片段的克隆进行测序验证。
10. 大量培养测序正确的克隆并用碱裂解法提取 DNA（大量制备，CPI 单元 10.3）。
11. 用 *Pvu*I 限制性内切核酸酶将融合质粒 DNA 线性化（如 MHC 片段含有 *Pvu*I 位点则换用别的酶）。同样用 *Pvu*I 限制性内切核酸酶将含有人 β_2 微球蛋白基因组序列的质粒线性化。用琼脂糖凝胶电泳验证酶切完全与否（如 β_2 微球蛋白应产生两条带）。
12. 用酚/氯仿抽提 DNA，然后进行乙醇沉淀，用 0.1 体积的 pH5.2、3mol/L 乙酸钠缓冲液及 2 体积 100%的乙醇。－20℃培养 30min。4℃，最高速度微量离心 DNA。用无菌的去离子水重悬 DNA，使其浓度为 1mg/ml。
13. 用溴化乙锭斑点法对 DNA 进行定量（CPI 单元 10.5）。
14. 培养 J558L 细胞至密度为 1.0×10^6 个细胞/ml，计数细胞（附录 3A，每份转染需要 7.6×10^6 个细胞）。
15. 向一个 $25cm^2$ 的培养瓶中加入 7.2ml RPMI-10/HEPES 完全培养基并保温至 37℃，并将电转杯置于冰上。
16. 用 RPMI-10/HEPES 完全培养基洗涤细胞一次。4℃，300*g* 离心 5min，弃上清。用 RPMI-10/HEPES 完全培养基重悬细胞，使其浓度为 1×10^7 个细胞/ml，吸取 760μl 至电转杯中。
17. 将 4μg 线性化的 MHC-Ig 质粒 DNA 及 40μg 线性化的 β_2 微球蛋白基因组 DNA 加到细胞悬液中，在冰上孵育 10min。
18. 用 Bio-Rad Gene Pulser 以如下参数进行电穿孔：960μF 和 0.35kV（时间常数为

18～22ms）。将细胞放回冰上并孵育 10min。

19. 将细胞转入 25cm² 的含有预温培养基的培养瓶中。不加筛选药物，于 37℃ 孵育过夜。

20. 用台盼蓝拒染法测定细胞的活力（附录 3C）。预期活力为 10%～50%（活力>50% 可能提示电穿孔效率较低）。

21. 将细胞在 4℃，500g 离心 10min。用含有 1mg/ml G418 的 RPMI-10/HEPES 完全培养基重悬细胞。将细胞稀释后接种于 96 孔平底板中，使每一孔中含有约 0.3 个对 G418 有抗性的细胞（假定 1000 个活细胞中仅有 1 个细胞能产生对 G418 有抗性的克隆）。37℃将细胞孵育 2 周，使细胞扩增至汇合生长。

22. 用 ELISA 法（见辅助方案 1）检测细胞克隆分泌 Ig 样分子的情况，将阳性克隆扩增。

辅助方案 1　测定 MHC-Ig 融合蛋白浓度

有两种方法用于测定 MHC-Ig 融合蛋白的浓度。根据包被 ELISA 板所用的一抗类型不同（羊抗鼠 IgG1 Fc 片段或抗鼠 MHC 单克隆抗体），其对应的 ELISA 所测定的分别是 Ig 样蛋白的浓度和 MHC-Ig 嵌合蛋白的浓度。

材料

抗体：

羊抗鼠 IgG1（Southern Biotech）

抗鼠MHC I类分子单克隆抗体（mAb），κ 链（如 BB7.2、W6-32、30.5.7s、20.8.4；ATCC）

碳酸盐缓冲液：5.26g/L 无水碳酸钠，pH10.4（用盐酸调节）

封闭缓冲液：1%（*V/V*）FBS，用碳酸盐缓冲液配制

洗涤缓冲液：PBS（附录 1），含 1%（*V/V*）FBS 及 0.5%（*V/V*）Tween 20

稀释缓冲液：PBS，含 1%（*V/V*）FBS

标准品，比如鼠 IgG1 λ 链标准品（Pharmingen）或 MHC-Ig 标准品（Pharmingen）

样品：含 MHC-Ig 的上清（见基本方案）

辣根过氧化物酶偶联的羊抗鼠 λ 轻链二抗（抗鼠 λ-HRP，Southern Biotechnology）

终末洗涤缓冲液：PBS，含 0.5%（*V/V*）Tween 20

显色剂：TMB 一步法底物系统（Dako）

0.5mol/L H_2SO_4

96 孔 ELISA 板：高蛋白结合容量，用于酶联免疫检测/放射免疫检测的半域板（EIA/RIA；Costar）

96 孔板酶联仪，450nm

1. 用含有 10μg/ml 相应抗体的碳酸盐缓冲液包被 96 孔 ELISA 板，每孔 50μl。用羊抗鼠 IgG1 包被一行对照孔用于鼠 IgG1，每一个样品有半行孔需要用鼠 IgG1 标准品测定。在另一个板子上，用抗鼠 MHC I 类分子单克隆抗体包被，每一个样品包被一

孔。每一块板子设置2孔作为空白，室温孵育1h。

2. 向每一孔中加入50μl封闭缓冲液，并在室温孵育≥1h。
3. 洗涤板子3次，每一孔每次用200μl洗涤缓冲液。最后一次洗涤后，去除所有残留的液体，每一孔中加入50μl稀释缓冲液。
4. 用稀释缓冲液配制标准品及样品。将标准品稀释至100ng/ml，将样品稀释至标准品的浓度范围之内。
5. 在ELISA板子上进行2倍的连续稀释，将50μl的标准液或样品溶液加入第1行。从第1行吸取50μl加入第2行，再从第2行吸取50μl加入第3行，以此类推。最后一行则弃掉50μl。每一块板子上留2孔作为空白（含50μl稀释缓冲液，步骤3），室温孵育1h，每孔用200μl洗涤缓冲液洗涤3次。
6. 向每一孔中加入用稀释缓冲液按1∶5000～1∶10 000稀释的抗鼠λ-HRP稀释液，每孔50μl，室温孵育30～45min，每孔用200μl洗涤缓冲液洗涤3次。
7. 向每一孔中加入50μl显色剂，等2～15min直到标准孔开始变蓝。向每一孔中加入25μl 0.5mol/L的H_2SO_4以终止显色反应。
8. 将板子的底部擦干净，如果孔中有气泡则将气泡除掉。在终止反应后10min之内用96孔板酶联仪在450nm读取数据。

辅助方案2 J558L转染细胞大规模培养及上清的浓缩

材料

J558L转染细胞（见基本方案）
杂交瘤SFM培养基（Life Technologies）
G418（Life Technologies）
10%（*m/V*）叠氮钠（Sigma）
蛋白酶抑制剂，如苯甲基磺酰氟（PMSF）和亮抑酶肽（leupeptin）（Boehringer Mannheim），可选
$75cm^2$和$175cm^2$细胞培养瓶
0.45μm滤膜
蛋白质浓缩系统，如Hollow Fiber Concentrator（A/G Technology）或Centriflo membrane cone（CF50A membrane；Amicon）

1. 用杂交瘤SFM培养基将J558L转染细胞以0.25×10^6个细胞/ml的浓度接种至含20ml培养基的$75cm^2$细胞培养瓶中。在1mg/ml G418的条件下维持培养3d，这时培养基应该开始变黄（预期密度为1×10^6个细胞/ml）。
2. 细胞扩增培养，从$75cm^2$的接种瓶中取15～20ml的细胞悬液加入$175cm^2$的细胞培养瓶，并加入3倍体积的杂交瘤SFM培养基，不加G418。2～3d内，加入新鲜培养基使总量达到$175cm^2$的细胞培养瓶的最大体积（150～250ml）。
3. 用显微镜观察细胞并用ELISA测定蛋白质的产量（见辅助方案1）以确定收获上清时的最佳细胞浓度。当细胞达到某一密度（如1.5×10^6～1.8×10^6个细胞/ml）并且活细胞为70%～80%时，4℃，300g离心10min收集上清。

4. 用 0.45μm 滤膜过滤上清，加入叠氮钠至 0.1%以防止污染。如果需要，加入蛋白酶抑制剂以抑制复合物降解。如果 1～2 周内不对上清进行纯化（见辅助方案 3），则将上清保存于−20℃，可保存达 6 个月。
5. 用商业化的蛋白质浓缩系统对 MHC-Ig 二聚体进行浓缩。

   杂交瘤 SFM 培养基含有大量的胰岛素和转铁蛋白。尽管大多数浓缩技术不能浓缩胰岛素，但可以将转铁蛋白（分子质量约 80 000kDa）与 MHC-Ig 一起浓缩。如果需要纯化的蛋白质，则必须将 MHC-Ig 与转铁蛋白分开，或者使用别的杂交瘤培养基。

辅助方案 3 用 5-碘-4-羟基-3-硝基酚乙酰-琼脂糖凝胶层析法纯化 MHC-Ig 二聚体

pXIg 质粒含有对 4-羟基-3-硝基酚乙酰（4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl，NP）特异的免疫球蛋白可变区结构域。

材料（带√项目见附录 1）

5-碘-4-羟基-3-硝基酚乙酰（5-iodo-4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl，NIP)-琼脂糖凝胶树脂（见辅助方案 4）或 5ml NIP 琼脂糖凝胶柱（Biosearch Technologies）
√PBS
含 MHC-Ig 融合蛋白的细胞上清（见基本方案 2）
√洗脱缓冲液
PBS，含 0.02%（m/V）叠氮钠（Sigma）
Centriflo cones（Amicon）

1. 可选：用 PBS 配制 50%（m/V）NIP 琼脂糖树脂悬液。将含有 5ml 填装好的 NIP 琼脂糖的柱子里面的液体倒掉，将柱子在 4℃避光保存。
2. 使用前，用 3 倍柱床体积的 PBS 洗涤柱子。
3. 用含有 MHC-Ig 融合蛋白的细胞上清过柱，流速≤1ml/min（每个柱子的结合容量通常≤10mg MHC-Ig）。将流出的样品液收集并保存以用于后续的分析及出现问题时查找原因。
4. 用 25ml（5 倍柱床体积）PBS 洗涤柱子，并让洗涤液完全流出。收集流出的洗涤液并保存用于后续的分析及出现问题时查找原因。
5. 加入 15ml（3 倍柱床体积）洗脱缓冲液，收集流出的洗脱液。然后再加入 15ml PBS 并继续收集洗脱液直至总体积为 25～30ml。
6. 用 4 倍柱床体积的 PBS 淋洗柱子并保存于含 0.02%叠氮钠的 PBS 中。
7. 用 Centriflo cones 浓缩含有二聚体蛋白的洗脱液。
8. 在 4℃用 PBS 对浓缩样品进行透析（CPI 附录 3H）以去除游离的 3-硝基-4-羟基-酚乙酰-氨基己酸（3-nitro-4-hydroxy-phenylacetyl-aminocaproic acid，NP-CAP-OH），每次用 500ml PBS，一共透析 2 或 3 次。
9. 用 ELISA（见辅助方案 1）和（或）SDS-PAGE（单元 12.3）对最终得到的蛋白质进行定量。

辅助方案 4　制备 5-碘-4-羟基-3-硝基酚乙酰-琼脂糖凝胶

尽管 NIP 琼脂糖凝胶已有商业化的产品，但也可以自行按照该方案所描述的方法大批量制备（制成品可以稳定 5 年或更长时间）。

材料（带√项目见附录 1）

N-(3-氨丙基)-1,3-丙烷二胺（Aldrich）
浓盐酸
CL-4B 琼脂糖凝胶（Pharmacia）
0.1mol/L NaOH
2mol/L Na_2CO_3（Sigma）
0.1mol/L $NaHCO_3$，pH9.5（Sigma）
溴化氰（CNBr；Sigma）
20mmol/L 叠氮钠（Sigma），分别用水及 PBS 溶液配制
3%（*m/V*）$NaHCO_3$（Sigma）
3-硝基-4-羟基-酚乙酰-氨基己酸琥珀酰亚胺酯（NIP-CAP-OSu，相对分子质量为 423；Biosearch Technologies）
二氧杂环己烷（dioxane；Aldrich）
√PBS
1L 锥形烧瓶
1L 的瓶子
1L 玻璃烧结漏斗

注意：此处使用的几种化学品对人体有害。使用时需采取适当的安全防护措施。

注：所有的玻璃器材和溶液应该是无内毒素的。将玻璃器材在 200℃烘烤≥4h，或者用 0.1mol/L NaOH 浸泡，再用蒸馏水洗，也可以高压消毒。最好所有溶液都用处理过的玻璃器材配制并立即高压消毒。

1. 在通风柜内，将 160ml *N*-(3-氨丙基)-1,3-丙烷二胺倒入一个烘烤过的容量为 1L 的锥形烧瓶里。将烧瓶置于冰上，在 4℃下，用浓盐酸将其 pH 调到 10。
2. 用下列溶液依次洗涤 320ml（1 体积）包装的 CL-4B 琼脂糖凝胶：
   约 10 体积 0.1mol/L NaOH
   5 体积水
   2 体积 2mol/L Na_2CO_3。
3. 将 2 体积 Na_2CO_3 转入一个烤干的 1L 的瓶中，置于室温。
4. 将 1L 0.1mol/L $NaHCO_3$ 置于冰上。在通风柜内，将 100g CNBr 置于装有温水的烧杯内融化（CNBr 在室温下呈液态）。
5. 将 16ml CNBr 加入琼脂糖凝胶中并在室温下强力搅拌 1～2h。
6. 在 1L 玻璃烧结漏斗上，将琼脂糖凝胶沥干并用 10 倍体积的冰冷的 0.1mol/L $NaHCO_3$（步骤 4）洗涤。
7. 用铲子将活化的琼脂糖凝胶转移到一个 1L 的瓶子并加入氨丙基（步骤 1）。4℃搅拌

过夜。

8. 将琼脂糖凝胶在玻璃烧结漏斗上用水洗涤，重悬于 20mmol/L 叠氮钠水溶液中。室温下保存（最长可保存 1 周）。
9. 用水洗涤琼脂糖凝胶，重悬于 900ml 冰冷的 3%$NaHCO_3$。
10. 对每 100ml 包装的琼脂糖凝胶而言，将 75mg NIP-CAP-OSu 溶解于 1.2ml 二氧六环中，将溶解的 NIP-CAP-OSu 加入琼脂糖凝胶中并在 4℃搅拌过夜。
11. 用 1L PBS 洗涤凝胶，重悬于 200ml 20mmol/L 叠氮钠 PBS 溶液中。有效的偶联将形成黄色的凝胶。

辅助方案 5　通过被动交换法为 MHC-Ig 嵌合蛋白负载多肽

材料（带√项目见附录 1）

1mg/ml MHC-Ig 二聚体蛋白（见辅助方案 3）
2mg/ml 多肽储存液（纯度>95%），用水或 DMSO 配制
1mg/ml 人 β_2 微球蛋白（Sigma）
1%（m/V）叠氮钠（Sigma）
√PBS
50MWCO 的锥形滤器（Amicon）

1. 将下列溶液加到 10～50μl 浓度为 1mg/ml 的 MHC-Ig 二聚体蛋白溶液中：
   1μl 2mg/ml 多肽储存液
   5μl 1mg/ml 人 β_2 微球蛋白（2 倍摩尔过量）
   加入适量的 1%叠氮钠使其终浓度为 0.01%。

   在 4℃孵育 2～5d。
2. 可选：用于细胞检测时需去除过量的多肽，在 50MWCO 的锥形滤器（Amicon）中用 PBS 洗涤肽-MHC-Ig 复合物。
3. 在进行流式细胞（见辅助方案 8）分析之前，可将负载多肽的复合物放置在 4℃保存数月。
4. 可选：使用前，用构象敏感的 ELISA 法（见辅助方案 1）进行检测，并用已知的阳性对照 T 细胞系进行流式细胞标记对负载多肽的 MHC-Ig 进行功能性检测。

辅助方案 6　碱洗脱法负载多肽

材料

肽洗脱缓冲液：150mmol/L NaCl，15mmol/L Na_2CO_3，pH11.5
MHC-Ig 二聚体蛋白（见辅助方案 3）
溶解于水或 DMSO 的多肽
中和缓冲液：250mmol/L Tris·Cl，pH6.8（附录 1）

1. 向 MHC-Ig 二聚体蛋白溶液中加入 5～10 体积肽洗脱缓冲液，调节 MHC-Ig 的浓度为 100～400μg/ml，室温下孵育 20min。

2. 加入 40 倍摩尔过量的多肽溶液并用中和缓冲液调节至 pH7.2。4℃孵育24～48h。
3. 在进行流式细胞（见辅助方案 8）分析之前，可将负载多肽的复合物在 4℃保存数月。
4. 可选：使用前，用构象敏感的 ELISA 法（见辅助方案 1）进行检测，并用已知的阳性对照 T 细胞系进行流式细胞染色对加载多肽的 MHC-Ig 进行功能性检测。

辅助方案 7 温和酸性条件下负载多肽

材料

柠檬酸/磷酸缓冲液（见配方）
MHC-Ig 二聚体蛋白（见辅助方案 3）
溶解于水或 DMSO 的多肽
人 β_2微球蛋白（Sigma）
2mol/L Tris 碱溶液

1. 向 MHC-Ig 二聚体蛋白溶液中加入 5～10 体积柠檬酸盐/磷酸盐缓冲液，使 MHC-Ig 的浓度为 50～100μg/ml。
2. 加入 40 倍摩尔过量的多肽溶液及 2 倍摩尔过量的人 β_2微球蛋白，37℃孵育1.5～2h。
3. 用 2mol/L Tris 碱溶液调节至 pH7.2，并让其在 4℃再折叠≥24h。
4. 在进行流式细胞（见辅助方案 8）分析之前，可将负载多肽的复合物在 4℃保存数月。
5. 可选：使用前，用构象敏感的 ELISA 法（见辅助方案 1）进行检测，并用已知的阳性对照 T 细胞系进行流式细胞染色对负载多肽的 MHC-Ig 进行功能性检测。

辅助方案 8 流式细胞分析抗原特异性 T 细胞

材料（带√项目见附录 1）

待染色的抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞［来自外周血、鼠脾细胞或 T 细胞系和（或）T 细胞克隆］，如果需要的话，对 $CD8^+$ T 细胞进行富集（见第二章）
√FACS 缓冲液
负载多肽的 MHC-Ig（见辅助方案 5、6 或 7）
藻红蛋白标记的羊抗鼠 IgG1（抗 IgG1-PE；Caltag 或 Southern Biotechnology）或生物素标记羊抗鼠 IgG1（抗 IgG1 生物素；Caltag）
抗 CD8-FITC（Sigma）：荧光素标记的抗鼠 CD8 或抗人 CD8（UCHT-4 克隆）
藻红蛋白标记的亲和素（亲和素 PE，Caltag），可选（用于抗 IgG1 生物素）
1%（*m/V*）多聚甲醛，可选

1. 每一个样品管中加入待染色的 1×10^6抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞。用 2ml FACS 缓冲液洗涤细胞并在 4℃，500g 离心 10min，弃上清。
2. 加入 10μl 负载多肽的 MHC-Ig 至终浓度为 50～500μg/ml（根据经验确定最佳浓度），在冰上孵育 60～90min。

3. 加入 2ml FACS 缓冲液，在 4℃，500g 离心 10min，弃上清。
4. 加入 1μl 抗 IgG1-PE 或抗 IgG1 生物素，在冰上孵育 20min。
5. 加入 2ml FACS 缓冲液，在 4℃，500g 离心 10min，加入 10μl 抗 CD8-FITC（如果需要，同时加入亲和素 PE），在冰上孵育 20min。
6. 用 2ml FACS 缓冲液洗涤两次，弃上清，加入 0.3ml FACS 缓冲液。
7. 立即用流式细胞仪对样品进行分析（见第四章）或用 1%多聚甲醛固定细胞以备随后分析。

参考文献：Dal Porto *et al.*，1993；Greten *et al.*，1998

撰稿人：Jonathan P. Schneck，Jill E. Slansky，Sean M. O'Herrin，and Tim F. Greten

单元 15.2　用 MHC 肽四聚体显现抗原特异性 T 细胞

该单元描述了一种产生合成的 TCR 配体（MHC I/肽“四聚体”）的直接方法，以及用诸如荧光素或藻红蛋白等荧光标签通过链亲和素来对四聚体进行标记。

策略设计

制备 MHC I/肽四聚体前，首先要对其精确的特异性进行确认，即 MHC I 类限制性成分（MHC I 类分子）和已界定的最小或最佳肽段对目的 T 细胞群体的特异性。查明所需的 MHC/肽四聚体是否有商业化的产品可用（如 Beckman Coulter；http://www.immunomics.com），以及过敏性与感染性疾病国立研究院（National Insititute of Allergy and Infectious Diseases，NIAID）——一个专门生产四聚体的部门（http://www.niaid.nih.gov/reposit/tetramer/index.html）是否供应相应的成品。此外，务必确认拟用的抗原肽确实与目的 MHC I 类分子结合。

研究人员还应该清楚从何处可以获得编码羧基端带有 Bir 标签的 MHC 重链 cDNA 及适当的细菌表达载体。其中很多被普遍使用的分子序列可以从发表了使用这些分子的文献作者那里获得。需要考虑的还包括四聚体的用量（也就是说，是用于有限数量实验的 T 细胞检测，还是用于广泛的大量的检测），以及是否用于流式细胞染色，若是，则进行特定荧光素标记。此外，可建立一个可以更新的阳性对照细胞库源以用于评估每一个四聚体的完整性及其性能，这不一定是必需的但却极有价值。

制备带 BSP 标签的 MHC I 类分子亚单位的包含体

作者用来表达人 β_2 微球蛋白的载体是 pHN1-β2m（Garboczi *et al.*，1992），该载体可以从 NIAID 的 David Garboczi 博士（dgarboczi@nih.gov）处获取。作者曾经使用人 β2m 来制备人、鼠及猕猴 MHC 肽复合物。鼠 β2m 表达载体可以从纽约的 Memorial Sloan-Kettering 癌症中心的 E. Pamer 博士（pamere@msku.org）处获取，或从 NIAID 的 D. H. Margulies 博士（dhm@nih.gov；http://www.niaid.nih.gov/dir/labs/li/margulies.html）处获取。基于 Novagen 公司的 pET 系列载体的 T7 表达系统

可以将 MHC I 类分子的重链可溶性结构域与 BirA 底物肽（BirA substrate peptide，BSP）融合表达。其基本结构见图 15.2.1。不同的载体可以编码不同的 BSP 序列（Avidity；http://www.avidity.com）。作者发现：含有 BSP41（Schatz，1993）的 MHC 融合蛋白在室温下过夜反应后几乎完全生物素化，因此他们就未曾系统性地探索其他的 BSP 序列。

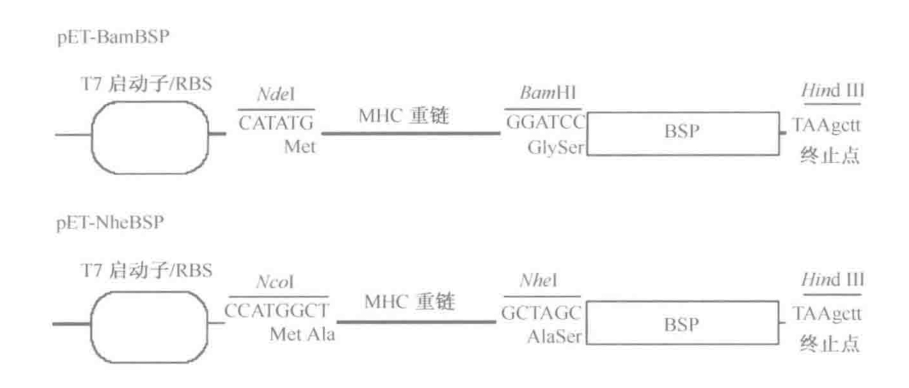


图 15.2.1　MHC I 类分子重链的可溶性结构域与 BSP 融合表达载体。

表达载体主要有两类，其差别是质粒选择的抗生素抗性基因不同及用于亚克隆编码 MHC I 类分子重链可溶性结构域的 PCR 产物的限制性内切核酸酶位点不同。在第一类载体——pET-BamBSP 中，BSP 紧位于 pET23a（+）或 pET24a（+）载体（Novagen）的多接头的 *Bam*HI 位点之后并且读框相符。MHC 重链可溶性结构域基因编码成熟蛋白的 1～280 位氨基酸，PCR 扩增时使用的 5′引物含有一个与读框一致的 *Nde*I 位点，3′反义引物含有一个紧跟于第 280 位氨基酸之后的且读框相符的 *Bam*HI 位点。PCR 产物用 *Nde*I 和 *Bam*HI 酶切后亚克隆至经同样的酶消化的 pET-BamBSP 载体。当亚克隆的 *MHC* 基因内部含有 *Nde*I 或 *Bam*HI 位点时，则要使用第二类载体——pET-NheBSP，这类载体是用 pET23d（+）或 pET24d（+）质粒改建而得。亚克隆至这类载体时，5′引物含有一个 *Nco*I 位点并且设法使其 ATG 序列与 *MHC* 基因读框一致，3′反义引物含有一个紧位于第 280 位氨基酸之后的 *Nhe*I 位点。与 *Nde*I 位点不同的是，*Nco*I 位点中 ATG（图 15.2.1）并不能自动地与 MHC 成熟蛋白的余下序列的读框匹配，如果成熟蛋白的第 1 个密码子的第 1 个核苷酸不是 G 的话，那么在 *Nco*I 位点和 MHC 成熟蛋白的第 1 个密码子之间必须添加 2 个核苷酸：

5′-C^CATG-G-3′
3′-G-GTAC^C-5′

在 MHC-BSP 融合蛋白的前 6～10 个氨基酸的密码子中通过沉默突变来减少其 GC 含量后，常常可以增强融合蛋白的表达。在设计减少前 6～10 个氨基酸的密码子的 GC 含量的引物时，应使引物的长度适当加长以确保含有一段与靶序列完全匹配的长度至少为 18bp 的序列。

克隆至表达载体中的 *MHC* 基因的完整性应通过测序证实（CPI 单元 10.25）。其 5′端可以用标准的 T7 测序引物（即 5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′）来进行测

序。其 3′端可以用 T7 终止引物（Novagen；即 5′-GCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3′）或能与 bsp41 编码序列杂交的引物（即 5′-CTTTTAACGATGATTCCACACC-3′）进行测序。

与 MHC 四聚体配合使用的染色试剂

MHC I类分子四聚体几乎总是与一种或多种抗体配合使用（这些抗体所标记的荧光基团相互之间应是兼容的，且与四聚体所标记的荧光基团也应是兼容的），这些抗体以一种多层次的方式界定相关的淋巴细胞亚群。例如，通常将四聚体与抗 CD3 和 CD8 特异性抗体联合使用。其中 CD3 抗体用来鉴别所有淋巴细胞中的 T 细胞亚群，而 CD8 抗体则用来鉴别所有表达 CD8 分子的 T 细胞，因而可能识别自身 MHC I类分子的那一群 T 细胞。这两种抗体所界定的这群 T 细胞常常在计算抗原特异性 T 细胞（即四聚体阳性的细胞）的观测频率时用作分母，比如常这样表述，“在所有 $CD3^+CD8^+$ T 细胞中，四聚体阳性细胞占 0.32%”。有多种分级设计程序可以用于获取 FACS 数据。图 15.2.2 给出了一个这样的例子，数据来自作者研究 Mamu-A*01 阳性猕猴对 SIV gag 的 p11C 多肽表位的 CD8 应答情况。图中的数据是将全血样品用 Mamu-A*01/p11C 四聚体、抗 CD3、抗 CD8 和抗 CD62L 染色所得。左边的图表示整个样品的前向及侧向散射图，围绕淋巴细胞的区域设“门”。在中间的图中，仅左图中落于淋巴细胞“门”区域的细胞才被显示出来，围绕 $CD3^+$ 和 $CD8^+$ 的细胞群设第二“门”。最后，在右边的图中，前两个“门”中所界定的细胞中被四聚体染色的细胞图示于纵坐标，被淋巴结归巢受体——CD62L 染色的细胞以横坐标表示。$CD3^+$ 和 $CD8^+$ 细胞中能被四聚体染色的那部分细胞的频率为右图中上面两个四分象限之和，即 2.99%。这个例子显示了如何使用抗体染色来更好地界定用于计算四聚体阳性细胞频率的分母，以及根据一群感兴趣的“表型”标记中的某一个的表达与否还可以将四聚体阳性细胞进一步分群，这些标记还能提供关于抗原特异性细胞的一些额外信息。

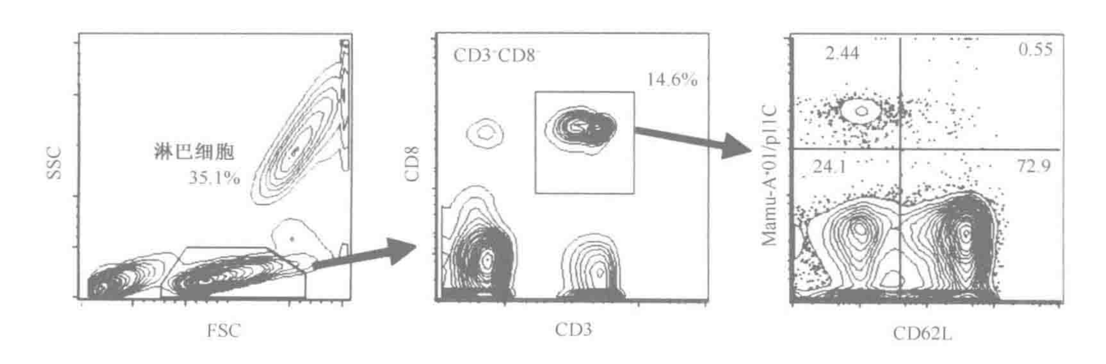


图 15.2.2 数据设“门”举例。图中表示的是 Mamu-A*01 阳性猕猴对 SIV gag 的 p11C 多肽表位的 CD8 应答情况。详情见正文。FSC，前向散射；SSC，侧向散射。

图 15.2.2 显示的仅是染色和设“门”策略的一个例子，还有许多有效的替代方案可供选用。有时，最佳策略取决于你所感兴趣的那群细胞与种属特异性相关的一些性质。例如，图 15.2.2 中间的小图里面，有一群 $CD3^-CD8^+$ 细胞被排除在门控区域之

外。这群细胞的绝大多数属于 NK 细胞系，因此在计算四聚体阳性细胞时应该剔除这群细胞。在小鼠中，CD8 经常不表达于大多数 NK 细胞，因此 CD3 染色常常省略而仅依靠 CD8 染色来鉴定 $CD8^+$ T 细胞群体。然而，人 NK 细胞却常常表达 CD8，尽管其表达水平低于人 T 细胞和猕猴 NK 细胞。因此，用人的细胞进行实验时，可以适当省略 CD3 染色而仅对 $CD8^{bright}$ 细胞群设门来界定 $CD8^+$ T 细胞。在大多数情况下，作者认为，当使用四聚体和人的样品时最好同时包含 CD3 和 CD8 抗体染色，尽管在四色流式细胞分析时，CD3 染色经常必须牺牲掉从而可以对一个以上的表型标记进行染色，如穿孔素和颗粒酶 B 的联合，以及许多其他标记。最后，研究人员应该清楚，有几篇报道指出某些对 CD3 和 CD8 特异的单克隆抗体可能会显著抑制四聚体结合，但在有些情况下，有可以替代的、非阻断性抗体克隆可供选择（Daniels and Jameson，2000；Hoffmann *et al*.，2000）

基本方案 1　制备带 BirA 底物标签的 MHC I 类分子亚单位的包含体

材料（带√项目见附录 1）

用于表达的 *E. coli* 感受态细胞［如 BL21（DE3）；Novagen 或 Stratagen］

MHC-BirA 底物肽（BSP）表达载体（见策略设计），其中的 MHC 序列经测序验证过

√选择性 LB 平板和培养基

20%（*V/V*）甘油/选择性 LB 培养基，冰冷

干冰/乙醇浴或液氮

20%（*m/V*）葡萄糖，无菌

表达 β2m 的 *E. coli*（如 pHN1-β2；Garboczi *et al*.,1992），其 β2m 的序列经过验证（仅当新制备 MHC/β2m/肽分子时才需此验证）

√LB 培养基，无抗生素（即非选择性）

抗生素储存液（选择与质粒抗性相对应的抗生素）

　100mg/ml 氨苄青霉素（或羧苄青霉素）

　40mg/ml 卡那霉素

√2×SDS/样品缓冲液，必要时用水稀释

400mmol/L 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）水溶液：过滤除菌后分装成 1ml 可于－20℃保存数月

√重悬缓冲液，冰冷

50mg/ml 溶菌酶

1.0mol/L $MgCl_2$

2mg/ml DNase I，溶于 50%（*V/V*）甘油/75mmol/L NaCl 溶液中

Triton X-100

1mol/L 二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）

√包含体洗涤缓冲液，含或不含 Triton X-100

√尿素溶液，新鲜配制

15ml 带帽试管
冻存管
1L 和 2L 长颈振荡培养瓶（baffled flask）
1L 离心瓶
Beckman Avanti J20 离心机和 JLA-8.100 转子或与其相当者，4℃
50ml 带螺纹盖的聚丙烯离心管
100ml 和 1000ml 聚丙烯烧杯
0.5in 搅拌棍
实验室用升降器
角型超声仪
25mm×89mm 多聚异质同晶试管（polyallomer tube）
Beckman GS-15R 离心机和 FO 630 转子或与其相当者，4℃
Tefon 或玻璃搅拌棒

1. 用 MHC-BSP 表达载体转化用于表达的 *E. coli* 感受态细胞（CPI 附录 3N）。将转化的细菌划线或涂布到选择性 LB 平板上（如 100μg/ml 氨苄青霉素或羧苄青霉素，100μg/ml 卡那霉素）。
2. 用无菌的接种环挑取转化细菌形成的单个克隆并接种到含有 3ml 选择性 LB 培养基的 15ml 带帽试管中，在摇床上于 37℃孵育直到 OD_{600} 约为 0.6（单元 10.3）。
3. 加入 3ml 冰冷的 20%（V/V）甘油/选择性 LB 培养基，用冻存管分装成 1ml。在干冰/乙醇浴或液氮中快速冷冻，然后将冷冻的甘油储存品置于－80℃保存。
4. 当从冷冻的甘油储存品取用细菌时，用一个无菌的吸头从表面刮取数微升然后在选择性 LB 平板上划线以产生单个克隆，37℃孵育过夜。若要保存，则用石蜡封口膜将平板缠绕后可于 4℃保存达 2 周。
5. 将转化的 *E. coli* 长成的单个菌落接种至含有 100ml 选择性 LB 培养基的 1L 的长颈振荡培养瓶中，补加 20%的葡萄糖使其终浓度为 1%，37℃振荡培养过夜。
6. 可选：如果是制备新的 MHC/β2m/肽分子，则对表达 β2m 的细菌进行平行的生长和处理，或者改天进行同样的处理并将包含体保存起来。
7. 对要制备的每一个蛋白质，预温 6 个 2L 的长颈振荡培养瓶，每瓶含有 500ml 非选择性 LB 培养基，在 37℃保温过夜，与步骤 5 的接种培养同时进行。
8. 第二天早上，向每一个培养瓶中加入适当的抗生素储存液。对于氨苄青霉素（或羧苄青霉素），加入 0.5ml 100mg/ml 的储存液（终浓度为 100μg/ml），对于卡那霉素，加入 1.25ml 40mg/ml 储存液（终浓度为 100μg/ml）。
9. 向每一个 2L 培养瓶中加入 10ml 过夜培养物（步骤 5）。于 37℃振荡培养直至 OD_{600} 达到 0.6～1.0（通常需 3～4h），取出 1ml 培养物并用微量离心管保留起来（加诱导剂前），标记为细菌细胞裂解物。
10. 将取出的 1ml 培养物在室温下以最高速度微量离心 5min。弃上清，沉淀先用 50μl 水完全重悬，然后加入 450μl 1×SDS/样品缓冲液。将样品冻存于－20℃用于下一步分析（可冻存达 1 周）。
11. 向每一个 2L 培养瓶中，对基于 pET23a（＋）载体（即含单纯 T7 启动子）的细菌

培养物加入 400mmol/L IPTG 水溶液至终浓度为 0.4mmol/L，对基于 pET24a（+）载体（即含杂合的 T7lac 启动子）的细菌培养物加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L，在 37℃孵育 4h。诱导后取出 0.5ml 培养物转至微量离心管中，标记为诱导后裂解物。将该样品重复步骤 10 的操作。

12. 将培养瓶中的培养物合并至 1L 的离心瓶中，用 Beckman Avanti-J20 离心机和 JLA-8.1000 转头在 4℃，4000*g* 离心 30min，仔细倒掉上清。每升培养物用 10ml 冰冷的重悬缓冲液将细菌完全重悬。
13. 将重悬的细菌分装至 50ml 带螺纹盖的聚丙烯离心管中（每管≤40ml），将离心管浸入液氮或干冰/乙醇浴中快速冷冻。保存于−80℃直到准备制备包含体。
14. 将细菌细胞裂解物（步骤 9）和诱导后裂解物（步骤 11）样品用 12%SDS-PAGE 胶分析 MHC I 类分子的表达，用 15%SDS-PAGE 胶分析 β2m 的表达（单元 12.3）。确认在分子质量分别为 40kDa 和 12kDa 处有明显条带，分别对应于 MHC I 类分子重链和 β2m。如果没有见到相应大小的条带，则从步骤 1 重新制备转化细菌。
15. 将步骤 13 冻存的细菌沉淀在 37℃水浴中溶解。待其刚好溶解但还没有升温以前，取出试管并将其内容物合并于一个 100ml 聚丙烯烧杯中，放入一个 0.5in 搅拌子，置于搅拌器上进行温和搅拌。
16. 向搅拌混合物中按下列顺序逐滴加入：

    1.2ml 50mg/ml 溶菌酶（终浓度 1mg/ml）

    300μl 1.0mol/L $MgCl_2$（终浓度 5mmol/L）

    1.0ml 2mg/ml DNase，在 5%甘油/75mmol/L NaCl 中

    600μl Triton X-100（终浓度 1%）

    600μl 1mol/L DTT（终浓度 10mmol/L）。

    室温下再搅拌 15min。
17. 为了确保细菌的完全裂解，取出搅拌棒，将含有细菌裂解液的 100ml 烧杯放入一个含有冰水混合物的 1000ml 烧杯中并使小烧杯的位置稳固。在超声仪的小柜中用实验室用升降器将烧杯升至某一高度以使得超声仪的探头能浸入烧杯最深但不接触烧杯底部。设置超声功率至少为 4，用 0.5s 脉冲进行超声 1.5min。
18. 将裂解液转移到 3 个 25mm×89mm 多聚异质同晶试管中，用 Beckman GS-15R 离心机和 FO630 转头在 4℃，10 000*g* 离心 10min。取出 50μl 上清至微量离心管中，标记为 S1，弃掉剩余的上清。加入 50μl 2×SDS/样品缓冲液至取出的上清中，可于−20℃冻存达一周，以备后续分析。
19. 向离心沉淀中加入 2ml 含有 Triton X-100 的包含体洗涤缓冲液。用 Teflon（或玻璃）搅拌棒将沉淀搅松，确保没有东西黏在离心管的底部。
20. 向试管中加入 15～20ml 含有 Triton X-100 的包含体洗涤缓冲液。将离心管置于一个含有冰水混合物的容器中并按照步骤 17 的参数进行超声。如果悬液还不是完全均一的话，重复超声。
21. 在 4℃，10 000*g* 离心 10min，取出 50μl 上清至微量离心管中，标记为 S2，弃掉剩余的上清。加入 50μl 2×SDS/样品缓冲液，按照 S1 样品冻存（步骤 18）。
22. 将步骤 19～21 重复 3～5 次，直到溶液颜色不再发生改变。用不含 Triton X-100 的

包含体洗涤缓冲液重复步骤 19～21。

23. 向沉淀加入 1～2ml 水，用 Teflon 搅拌棒将其调成均一的糊状。加入 10～20ml 新鲜配制的尿素溶液使包含体溶解。如果还有一定量的蛋白质没有溶解（可以通过溶液的浊度来反映），则增加尿素溶液的体积。使用所需的最小体积的尿素溶液，以方便下一步的稀释使序列折叠。
24. 将溶解的包含体在 4℃，20 000*g* 离心 10min，将上清移入一个干净的 50ml 带螺纹盖的聚丙烯离心管中。
25. 取少量样品用尿素溶液稀释 50 倍（如取 2μl 样品到 98μl 尿素溶液中）。测量溶液在 240～320nm 的 UV 吸收值。如果最大吸收值>1.5（即超出了仪器的线性范围），则进一步稀释并重新测量其 UV 吸收值。确认溶液的最小吸收值在 320nm，最大吸收值在 280nm 附近。320nm 的吸收值>0.03 表示比色杯中有气泡或存在一定量的不溶解的物质，如果是后一种情况，将样品再次离心（步骤 24）。
26. 用 Gill 和 von Hippel 的方法（1989），根据氨基酸组成，计算样品的近似消光系数。做此计算需假定蛋白质是纯的，估算样品的浓度。留取 2～4μg 溶解的包含体样品用于 SDS-PAGE 分析。
27. 将溶解的包含体分装，使其所含的蛋白质为 250nmol、500nmol 或 1000nmol。将这些分装样品在液氮中快速冷冻后保存于－80℃。
28. 将上述某些步骤中留取的小量样品（如 S1、S2、步骤 26 中尿素溶解的样品）用 12%的胶在还原条件下进行 SDS-PAGE 分析。

基本方案 2　MHC I 类分子肽复合物的重新折叠

材料（带√项目见附录 1）

√折叠缓冲液
谷胱甘肽，还原型及氧化型
100mmol/L PMSF 异丙醇溶液
MHC I 类分子重链和 β2m（见基本方案 1）
√注射缓冲液
目的肽，用质谱测定其组成
DMSO（可选）
10℃水浴
1L 烧杯
5ml 注射器和 26G 针头

1. 将 1L 折叠缓冲液在一个含有搅拌棒的 1L 的烧杯中用水浴预冷至 10℃。加入下列物质：
   还原型谷胱甘肽至 5mmol/L
   氧化型谷胱甘肽至 0.5mmol/L
   100mmol/L PMSF 异丙醇溶液至 0.2mmol/L。
2. 将含有 1000nmol MHC I 类分子重链（1μmol）和 2000nmol β2m（2μmol）的瓶子取

出并使其内容物融化，将每份样品的体积用注射缓冲液补足至5ml。

3. 根据肽的溶解性，用最小体积（如1ml）的水或DMSO溶解30mg目的肽（根据经验决定肽的最佳浓度）。
4. 将含有折叠缓冲液的烧杯（步骤1）置于搅拌器上高速搅拌，用微量加样器逐滴加入肽溶液。
5. 将26G针头套在5ml注射器上，依次将β2m和重链溶液强力注射入折叠缓冲液中，尽量靠近搅拌棒。
6. 将烧杯放回10℃并孵育6～12h（如过夜），如果可以的话，缓慢搅动折叠反应液，或者在4℃搅动12～24h。
7. 将另外的1μmol重链（步骤2）按上述（步骤5）加入折叠反应液中并放回10℃再孵育6～8h。
8. 再加入1μmol重链（最终是3μmol重链比2μmol β2m）并放回10℃孵育至少过夜或长至5d。
9. 可选：用三明治ELISA（见辅助方案1）测定折叠蛋白的产量，或取少量的折叠混合液用缩微版制备的凝胶过滤柱进行凝胶过滤分析折叠蛋白的产量。

辅助方案1　用ELISA测定MHC

本方法可以用于测定几乎任何来自人或猕猴的MHC I类分子。若要测定鼠MHC I类分子，则必须使用另外的俘获抗体。

材料（带√项目见附录1）

G25 PD-10柱子（Amersham Biosciences）
√PBS
折叠反应液，来自未知的MHC样品（见基本方案2）
5μg/ml W6/32单克隆抗体（ATCC＃HB-95）PBS溶液
ELISA封闭缓冲液：2%（*m*/*V*）BSA/0.1%（*m*/*V*）叠氮钠PBS溶液
HLA-A2，正确折叠（来自以前的实验）
ELISA洗涤缓冲液：0.05%（*V*/*V*）Tween 20 PBS溶液
兔抗β2m（β2m；Boehringer-Mannheim）
辣根过氧化物酶（HRP）偶联的羊抗兔IgG，经人、小鼠和大鼠血清蛋白吸附过（Jackson Immunoresearch）
10mg/ml 2，2′-连氮-双-(3-乙基苯丙噻唑啉磺酸)（ABTS）磷酸氢二铵
过氧化氢
柠檬酸盐缓冲液：0.2mol/L柠檬酸钠，用浓盐酸调节至pH4.0
Immuno-4 ELISA板（Dynex Technologies）
ELISA酶联仪

注：如果二抗是直接与HRP偶联的，则在ELISA封闭缓冲液中不加叠氮钠。

1. 根据厂商说明，用PBS平衡G25 PD-10柱子，加入2.5ml折叠反应液（即取少量样品）到柱子里面，弃掉流出液。将柱子的出口置于收集管的上方，向柱子里面加入

3.5ml PBS，收集流出的蛋白质样品。

2. 用 50μl 的 5μg/ml W6/32 单克隆抗体 PBS 溶液包被 Immuno-4 ELISA 板子，4℃过夜。
3. 用 PBS 将板子洗 2 或 3 次，每孔加入 350μl ELISA 封闭缓冲液并在室温下孵育至少 2h。
4. 制作标准曲线，用封闭缓冲液配制 100μl 正确折叠的 HLA-A2 储存液，浓度为 20μg/ml。向标准曲线系列孔的第 1 孔中加入 75μl HLA-A2 储存液，后续 7 孔则分别加入 50μl 封闭缓冲液。进行 3 倍连续稀释，从第 1 孔中取出 25μl 至第 2 孔混匀；然后从第 2 孔取出 25μl 至第 3 孔混匀，余下的孔以此类推。如果是第一次实验（也就是说，没有正确折叠的蛋白可用），可以这样来优化条件。

   上述连续稀释产生的稀释系列为：1∶3、1∶9、1∶27、1∶81、1∶243、1∶729 和 1∶2 187，其样品浓度为：20、6.7、2.2、0.74、0.25、0.082、0.027 和 0.0091μg/ml。
5. 对于柱子纯化的未知 MHC 样品（步骤 1），设置一个类似的 3 倍稀释系列。
6. 将所有稀释样品在室温下孵育 1～4h。用 ELISA 洗涤缓冲液充分地洗涤板子。
7. 用 ELISA 封闭缓冲液将兔抗 β2m 进行 1∶1000～1∶20 000 倍稀释（根据经验确定最佳稀释度）。向 ELISA 板的每孔加入 50μl。室温下孵育 1～4h。洗涤板子。
8. 用不含叠氮钠的 ELISA 封闭缓冲液将 HRP 偶联的羊抗兔 IgG 进行 1∶1000～1∶20 000倍稀释，每孔加入 50μl 并在室温下孵育 1～4h，洗涤板子。
9. 配制底物溶液，向 10ml 柠檬酸缓冲液中加入 200μl 10mg/ml 的 ABTS 和 7μl 过氧化氢，向每孔中加入 50μl 底物液。
10. 将 ELISA 板子在室温下孵育 10min～1h。用 ELISA 板子读测仪读取 490nm（参照）和 450nm 处的吸收值。
11. 用大多数 ELISA 板子读测仪提供的软件计算蛋白质浓度。

辅助方案 2　用分子大小排阻层析法进行超滤和纯化以浓缩折叠蛋白

可以在进行分子大小排阻层析前对 MHC/肽复合物进行生物素化（只要浓缩的蛋白质转换至生物素化缓冲液中），但该操作在此处不予叙述。

材料（带√项目见附录 1）

折叠反应液（见基本方案 2）
√PBS
葡聚糖凝胶 G250 PD-10 柱子
聚丙烯酰胺葡聚糖 S300 26/60 柱子
20mmol/L Tris·Cl，pH8.0（附录 1）/150mmol/L NaCl（可选）
Avanti J-25 离心机及 JLA-16.250 转头和 250ml 聚丙烯离心瓶
0.45μmol/L 滤膜
Amicon 8400　搅拌式超滤杯，配备 Biomax-30 膜（Millipore）及适当的氮源
50ml 聚丙烯试管

微量离心机，4℃

17mm×100mm 聚丙烯试管

MWCO 10 000（或 30 000）的 Ultrafree-15 离心浓缩器（Millipore）

1. 将折叠反应液转移到 250ml 离心瓶中。用 Avanti J-25 离心机及 JLA-16.250 转头在室温，15 000*g* 离心 30min 以去除任何沉淀的蛋白质。将上清用 0.45μmol/L 滤膜过滤。
2. 将过滤后的折叠反应液仔细地倒入配备有 Biomax-30 膜的 Amicon 8400 搅拌式超滤杯中（按照搅拌池及超滤膜的说明书操作）。如果折叠反应液大于 400ml，则分步浓缩，当搅拌池中液体的体积为 200ml 时，减压并加入适量的折叠反应液。将滤出液留存，因其含有高浓度的肽，可以回收再进行 2 或 3 次折叠反应。
3. 当滞留液的体积达到 25ml 时，减压并用 25ml 移液管测量其体积。重新加压并用量筒或试管收集剩余的滤出液。当搅拌式超滤杯中的溶液达到 7.5ml 时，停止浓缩。将最后的滞留液转移到一个 50ml 的聚丙烯试管。如果体积小于 7.5ml，用 PBS 补足。
4. 室温，10 000～14 000*g* 离心 10～15min 以去除沉淀物。
5. 将 3 个葡聚糖凝胶 G250 PD-10 柱子用 PBS 平衡，每个柱子用 25ml PBS。向每个柱子加入 2.5ml 浓缩的折叠反应液，弃掉流出液。将柱子的下端置于收集管上，加入 3.5ml PBS，收集流出液直至不再流出。
6. 将从 3 个柱子收集到的脱盐样品合并，分装到数个微量离心管中，4℃，最高速度离心 10min 以去除沉淀物。将上清合并。
7. 分离正确折叠的单体 MHC/肽复合物，将样品上样到聚丙烯酰胺葡聚糖 S300 26/60 凝胶过滤柱子。在 4℃ 或室温下，用 PBS 或 20mmol/L Tris · Cl，pH8.0/150mmol/L NaCl 以 2ml/min 的流速洗脱复合物。用 17mm×100mm 聚丙烯试管收集 8ml（4min）流出液部分。将含有单体 MHC/肽复合物的部分合并（即那些有 A_{280} 吸收峰的洗脱部分，共 190～200ml）。
8. 用 MWCO 10 000（或 30 000）的 Ultrafree-15 离心浓缩器将其浓缩至 1.0ml，按照厂商说明操作。
9. 测量体积及 260nm、280nm 和 320nm 的 UV 吸收值。用消光系数计算浓度，消光系数可以用重链、β2m、肽复合物的总体的氨基酸组成情况估算（Gill and von Hippel，1989）。

基本方案 3 用酶进行生物素化、纯化及生物素化效率的分析

材料（带√项目见附录 1）

√1mol/L Tris · Cl，pH7.5

5mol/L NaCl

1mol/L $MgCl_2$

100mmol/L 生物素，溶于 200mmol/L Tris 碱溶液（pH 未调）：可于－80℃长期保存

100mmol/L ATP：用 5mol/L NaOH 调节至 pH7.0；可于－80℃保存达 6 个月
100mmol/L PMSF 异丙醇溶液：可于室温保存达 1 个月
1mg/ml 亮抑酶肽
1mg/ml 抑胃酶肽甲醇溶液
MHC（见辅助方案 2，步骤 8）
BirA（Avidity）
√20mmol/L Tris·Cl，pH8.0，冰冷
MonoQ 5/5 柱子（Amersham Biosciences）
缓冲液 A：20mmol/L Tris·Cl，pH8.0
缓冲液 B：20mmol/L Tris·Cl（pH8.0）/500mmol/L NaCl
√含蛋白酶抑制剂的 PBS
液氮
0.8mg/ml 链亲和素 PBS 溶液，仅用于定性分析
√PBS，仅用于定性分析
√2×SDS/样品缓冲液，不含 DTT，仅用于定性分析
ELISA 封闭缓冲液：2%（*m/V*）BSA/0.1%（*m/V*）叠氮钠 PBS 溶液，仅用于定量分析
50%（*m/V*）洗过的链亲和素凝胶珠子（如 Sigma），仅用于定量分析
对照珠子：琼脂糖凝胶 4B 珠子（Sigma）或与其相当者，仅用于定量分析
15ml 带螺纹帽的聚丙烯试管
MWCO 10 000 的 Ultrafree-15 离心浓缩器（Millipore）或与其相当者
带螺纹帽的微量离心管

注：如果二抗是直接与 HRP 偶联的，则在 ELISA 封闭缓冲液中不加叠氮钠。

1. 向一个 15ml 带螺纹帽的聚丙烯试管中依次加入下列溶液：
   6.97ml H_2O
   1.0ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.5
   0.4ml 5mol/L NaCl
   0.05ml 1mol/L $MgCl_2$
   0.04ml 100mmol/L 生物素，溶于 200mmol/L Tris 碱溶液
   0.5ml 100mmol/L ATP
   0.02ml 100mmol/L PMSF 异丙醇溶液
   0.01ml 1mg/ml 亮抑酶肽
   0.01ml 1mg/ml 抑胃酶肽甲醇溶液
   1.0ml MHC
   0.015ml BirA。

   室温下孵育过夜。
2. 4℃，＞10 000*g* 离心 10～15min 以去除全部沉淀物。
3. 将 BirA 反应上清转移到一个 MWCO 10 000 的 Ultrafree-15 离心浓缩器中，将其置于转头的翻转吊桶内，4℃，2 000*g* 离心，直到溶液体积减至 1ml（15～30min）。

4. 向浓缩器内加入 10～12ml 冰冷的 20mmol/L Tris · Cl，pH8.0。仔细封口并颠倒混匀，按照步骤 3 离心，重复洗 5 次，总共 6 次。
5. 将生物素化的蛋白（≤5mg）上样到 MonoQ 5/5 柱子上，用 3～5ml 缓冲液 A 洗涤。按照表 15.2.1 给出的参数进行梯度洗脱，流速为 1.0ml/min，洗脱时每一部分收集 1.0ml。由于 MHC/肽复合物所带的净电荷不同，如果需要的话，调整分离相的缓冲液 B 的初始和终浓度（本例中分别为 10％和 40％）。当对一个新的 MHC/肽复合物建立梯度洗脱方案时，用 30μg 生物素化的 MHC 在分析柱上进行试验，并相应地调节梯度条件。

表 15.2.1 用 MonoQ 5/5 柱子纯化生物素化 MHC 的梯度洗脱参数

梯度时间/min	A 缓冲液/％	B 缓冲液/％
5	100～90	0～10
25	90～60	10～40
5	60～0	40～100
5[a]	0	100
5	0～100	100～0
10[b]	100％	0

a. 注意，这一段不是梯度，100％的 20mmol/L Tris · Cl（pH8.0）/500mmol/L NaCl 连续泵入 5min 以洗脱柱子上所有物质。

b. 100％的 20mmol/L Tris · Cl，pH8.0 用来重新平衡柱子。

6. 将具有吸收峰的部分合并，按照步骤 3 浓缩，按照步骤 4 交换缓冲液，用含有蛋白酶抑制剂的 PBS 替代 20mmol/L Tris · Cl，pH8.0。
7. 将蛋白质样品 1∶50 稀释后测定其 UV 吸收光谱并注意 280nm 的吸收峰。根据三个组分的氨基酸组成计算其消光系数（即重链、β2m、肽；Gill and von Hippel，1989），并据此估算蛋白质的浓度。用含有蛋白酶抑制剂的 PBS 将生物素化的 MHC/肽复合物的浓度调整至 2.0mg/ml。
8. 用带螺纹帽的微量离心管准备一批 100μl（200μg 蛋白质）的小量样品。单独准备一批 15μl 浓度为 0.4mg/ml 的生物素化 MHC/肽以对生物素化 MHC/肽复合物分部进行分析（步骤 9a 或 9b），在液氮中快速冷冻后于－80℃保存。

下面提供了两种方法来分析 MHC/肽复合物生物素化的情况。第一种方法（步骤 9a～13a）不能定量，但要简便得多，并且其提供的良好的定性结果常常足以满足需要。作者几乎不用第二种方法（步骤 9b～13b），但因其能提供更多的定量信息，故此处仍述及。

生物素化水平的定性分析

9a. 向 2 个分别标记为＋和－的微量离心管中加入 5μl 0.4mg/ml（2μg 蛋白质）的生物素化 MHC/肽复合物。

10a. 向＋管中加入 5μl 0.8mg/ml 的链亲和素（4μg）PBS 溶液，向－管中加入 5μl PBS，室温下孵育 1h。

11a. 加入 10μl 不含 DTT 的 2×SDS/样品缓冲液制备用于非变性电泳分析的样品。不要煮沸样品。

12a. 每个样品取 15μl 用标准的 12% SDS-PAGE 胶进行分析（单元 12.3）并用考马斯亮蓝染色（单元 12.4）。

13a. 估计生物素化百分率，观察含有链亲和素泳道（即+样品）MHC 重链亚单位染色强度。如果在该泳道仅能看见比较弱的自由 MHC 染色条带，则生物素化水平>95%。

在无链亲和素的样品（即一样品）偶尔能观察到 2 条蛋白带，且上面的那条带在链亲和素样品中不出现。作者认为这是至少有一部分 MHC 的 BSP 序列被切割下来，而具有全长序列的蛋白质是完全生物素化的证据。如果其表现程度较强的话，则有必要用新鲜的试剂，包括折叠缓冲液、层析缓冲液、PBS 等重新开始进行整个操作过程。

生物素化水平的定量分析

9b. 用 ELISA 封闭缓冲液将 0.4mg/ml 的冻存样品配制浓度为 1μg/ml 的 MHC/肽溶液 1.0ml。

10b. 取出 2 份 450μl，分别加入微量离心管中。向其中一管加入 50μl 的 50%（*m*/*V*）洗过的链亲和素凝胶珠子，另一管加入对照珠子（沉淀对照）。在室温下颠倒振摇 2h。

11b. 室温，200*g*（不要高于此速度）离心 1min 以沉淀珠子。

12b. 用前述的 ELISA 测定上清中 MHC 的浓度（见辅助方案 1）。一定要做宽范围的稀释系列。

13b. 将链亲和素琼脂糖凝胶样品的 MHC 浓度除以阴性对照沉淀样品的浓度，并用 1 减去该数值即是生物素化水平。

基本方案 4　用链亲和素使生物素化的单体形成多聚体

MHC 四聚体可以用通常用于流式细胞分析的大多数荧光标记物来标记。用藻胆蛋白，如藻红蛋白（phycoerythrin，PE）或别藻蓝蛋白（allophycocyanin，APC）常常能获得最强的信号并因此已用于绝大多数实验。

材料

2mg/ml 生物素化的 MHC 储存液，经过纯化（见基本方案 3）
PE 标记的链亲和素-PE（PE；Molecular Probes）或其他偶联物
棕色聚丙烯试管
带盖的盒子

1. 用重链、β2m 和肽的分子质量（通常为 45～50kDa；见基本方案 3）计算纯化的浓度为 2mg/ml 的生物素化 MHC 的摩尔数。
2. 计算链亲和素-PE 储存液的生物素结合位点（biotin binding site，BBS）的浓度。为了计算 BBS 的浓度，需先确定链亲和素偶联物的浓度（如 Molecular Probes 的链亲

和素-PE 浓度为 1mg/ml)，无论其浓度是仅用链亲和素来表示或者用链亲和素偶联物总体来表示（Molecular Probes 就是这样表示的)，还需确定标记物与链亲和素的比值（在本例中为 1∶1；并见表 15.2.2)。

1∶1 的链亲和素-PE 偶联物的平均分子质量为 300 000g/mol；因此其 BBS 的浓度为：

$$\frac{1\text{mg}}{1\text{ml}}\times\frac{1\text{g}}{1000\text{mg}}\times\frac{1000\text{ml}}{1\text{L}}\times\frac{1\text{mol}}{30000\text{g}}\times\frac{4\text{BBS}}{\text{mol}}=1.33\times10^{-5}\text{mol/L}$$

即 1.33×10^{-11}mol/μl 或 BBS/μl。

表 15.2.2　链亲和素偶联物的平均生物素结合位点数[a]

标记	相对分子质量	浓度/（mg/ml)	BBS/（mol/μl)
藻红蛋白	300 000	1	1.33×10^{-11}
别藻蓝蛋白	164 000	1	2.44×10^{-11}
FITC	60 000	1	6.67×10^{-11}

a. 假定浓度是指偶联物总体的浓度。

3. 计算所需链亲和素-PE 的用量，该用量将使得生物素化的 MHC 与 BBS 的比值为1∶1。

   例如，当向 200μg 生物素化的 MHC 中加入链亲和素-PE 时，链亲和素-PE (SA-PE) 的总体积应该是：

$$\frac{4\times10^{-9}\text{mol 生物素化 MHC}}{1.33\times10^{-11}\text{ mol BBS/μl SA-PE}}=164\text{μl}$$

4. 将链亲和素-PE 分成 0.1 体积逐步加入，每次加完后在室温下于暗处（如放入抽屉中）孵育 10～15min。
5. 将四聚体加入棕色的聚丙烯试管中并放入带盖的盒子在 4℃保存。由于每一种四聚体在 4℃的稳定性随 MHC 分子的不同尤其是配体肽的不同而差异较大，根据经验确定保存条件。大多数四聚体可在 4℃保存至少 3～6 个月；少数四聚体的半衰期非常短，在 4℃仅能保存几天。当使用本来就不稳定的四聚体时，每次实验用小量冻存的生物素化 MHC 单体新鲜制备四聚体。

基本方案 5　用标记的 MHC Ⅰ类分子四聚体通过流式细胞分析含特异性 T 细胞受体的细胞

当使用针对细胞表面标记的抗体（如 TCR-Vβ 抗体、抗 CD8）时，因为这些抗体也能与 MHC 四聚体作用，从而会影响四聚体染色的质量。

材料

标记的 MHC 四聚体（见基本方案 4）

FACS 缓冲液，冰冷：2%（*m/V*）BSA/0.1%（*m/V*）叠氮钠 PBS 溶液（附录 1）

标记的 CD8 抗体

阳性对照：抗原特异性 T 细胞系、克隆、杂交瘤或 T 细胞受体（TCR）转基因 T 细胞或来自对某一感兴趣的抗原具有很强而且特征明晰的应答个体的混合细胞

群（如脾细胞、PBMC）

目的细胞（如 PBMC，来自淋巴或非淋巴组织的单细胞悬液或全血）

用于 FACS 分析的染色试剂

1%（m/V）多聚甲醛 PBS 溶液，pH7.4，新鲜配制

1. 临用前用冰冷的 FACS 缓冲液稀释标记的 MHC 四聚体。
2. 用标准的染色程序，确定 MHC 四聚体试剂的滴度（最佳滴度通常在 1∶100～1∶200）。一般说来，可以将四聚体进行 3 倍连续稀释，起始浓度为 1∶10，用含有适当稀释的标记的 CD8 抗体的 FACS 缓冲液稀释。如果可以的话，用抗原特异性 T 细胞系、克隆、杂交瘤或 T 细胞受体（TCR）转基因 T 细胞作为阳性对照。或者，用来自对某一感兴趣的抗原具有很强而且特征明晰的应答个体的混合细胞群。
3. 将 1×10^6 个细胞在室温下，300g 离心 5min。弃上清。
4. 配制 1×染色混合液，该混合液含有适当稀释的所有试剂（至少应该含有 CD8 抗体和 MHC 四聚体）。加入 50μl 至细胞沉淀，充分混匀，4℃于暗处孵育 1h。
5. 用 150～200μl FACS 缓冲液洗涤细胞 2 或 3 次。用 1%多聚甲醛 PBS 溶液固定细胞。
6. 获取 FACS 数据（见第四章）。

对于许多四聚体染色实验，特定细胞群的频率可能会相当低。因此必须从大量的细胞获取数据以便获得较好的统计数据。

参考文献：Altman *et al*.,1996

撰 稿 人：John D. Altman and Mark M. Davis

［刘斌（第十五章）］

附录 1 试剂与溶液

本附录概略介绍了培养基及其成分，并收集了本书中所有的试剂、介质和溶液的配方。所有配方均按字母顺序排列，溶液名后的圆括号内列出使用该溶液的单元序号。一些很常用的溶液则不列出单元序号。某些情况下，如 PBS 会在通用配方后列出在其他特殊单元使用的特定配方。在某些配方中包括某种试剂，这种试剂在附录 1 中同时存在；这些条目用“见配方”或“√”表示。每一项特定的实验方案都必须使用合适的试剂配方；配制溶液也必须采用恰当的基质和储存液（例如，在单元 13.2 中的 PBST 必须用本单元的 PBS 配方配制）。

配制溶液均使用去离子水或双蒸水；试剂也须使用所能采用的最高等级纯度的产品。大多数室温下保存的溶液和用于细胞培养的溶液需经灭菌处理，灭菌方法包括 0.22μm 滤膜过滤或高压灭菌。一旦出现污染、沉淀或变色，就必须丢弃溶液。常用酸碱的摩尔浓度和比重见表 A.1.1。

注意：操作危险化学品时必须遵守标准的实验室安全规范，并留意产品制造商提供的防范措施。

表 A.1.1 常用酸碱的摩尔浓度和比重

酸/碱	分子质量	g /100g 溶液	摩尔浓度（近似）	1mol/L 溶液/（ml/L）	比重
冰乙酸	60.05	99.6	17.4	57.5	1.05
氨水	35.0	28	14.8	67.6	0.90
蚁酸	46.03	90	23.6	42.4	1.205
		98	25.9	38.5	1.22
盐酸	36.46	36	11.6	85.9	1.18
硝酸	63.01	70	15.7	63.7	1.42
水合高氯酸	100.46	60	9.2	108.8	1.54
		72	12.2	82.1	1.70
磷酸	98.00	85	14.7	67.8	1.70
氢氧化钾	56.11	45	11.6	82.2	1.447
		50	13.4	74.6	1.51
氢氧化钠	40.0	50	19.1	52.4	1.53
硫酸	98.07	98	18.3	54.5	1.835

培养基

基础成分和命名：常用含高糖的 RPMI1640 培养基和 DMEM 培养基作为基础培养

基，临用前加入胎牛血清（FBS）、谷氨酰胺、2-巯基乙醇（2-ME）、青霉素和硫酸链霉素配制成“完全”培养基。本手册中采用的其他的完全培养基包括 Click 和 IMDM。培养基的命名方法表明了其中基础培养基和 FBS 的含量。例如，“DMEM-10 完全培养基”意味着 DMEM 中加入了 10%FBS 和上述提到的其他成分。命名中缺少数字则意味着配方中没有血清成分。如果在某种用途时需要添加其他特殊成分，在标准配方后会附上这种新配方。

DMEM 培养基和 Click 培养基作为等渗溶液，较适于培养人类细胞的 RPMI 培养基，更适合与小鼠血清联用培养小鼠细胞。特别是在体外激活小鼠 B 细胞和 T 细胞时，当使用 RPMI 培养基不能得到满意结果时，建议采用 DMEM 培养基或 Click 培养基。

玻璃器皿：不要使用同一套玻璃器皿和搅拌棒配制基础溶液和其浓缩的储存液。玻璃器具用完后需在水中浸泡，以防止剩余化合物残留。塑料器具用于吸管和配制长期保存的溶液。

水：必须使用双蒸水配制缓冲液和培养基储存液。

抗生素：通常联合使用青霉素（100U/ml）和硫酸链霉素（100μg/ml）防止细菌污染。另一种更昂贵（也更稳定）的替代方法是采用 20～50μg/ml 庆大霉素。

胎牛血清：因为 FBS 成分难以确定，往往会带来很多变数，所以在每批培养基使用前要仔细检查。在大规模细胞培养前，采取小量不同批次、不同厂家的 FBS 联合基本培养基使用，以发现最适合目的细胞培养的 FBS 批次产品。选择培养效果最好而背景影响最小的 FBS 批次产品，大量购买作为实验所需。Armour 和 Hyclone 公司的 FBS 产品是可信赖的商品。

一般来说，在长期细胞培养前需要对 FBS 进行热激（56℃，1h）灭活处理。然而，加热并不是 FBS 处理的必须步骤，有时候甚至会带来副作用。建议按照本附录方法配制培养基。如实验需要，应对每批次 FBS 进行检测，以确定是否需要进行热处理。

FBS 能够导致人类细胞有丝分裂，所以在有些实验如培养人淋巴细胞时，可以用人 AB 血清代替 FBS。ABI 和 Per-Freez 公司的血清是可靠的产品。

2-巯基乙醇：某些实验包括初次免疫 T、B 细胞的培养基中必须加入 2-巯基乙醇。对于细胞培养来说，经常使用 2-巯基乙醇并不会导致副作用。必须在临用前，才能在培养基中加入 2-ME 储存液。

灭菌和储存：购买灭菌的培养基或培养基干粉。用干粉配制培养基时，必须过滤除菌，通常采用高速蠕动泵（500ml/min）和滤器。配好的培养基于 4℃保存。其他试剂在使用前加入培养基。FBS 和含 L-谷氨酰胺、非必需氨基酸和抗生素的储存液在 −20℃保存。HEPES 储存液可在室温下保存。2-巯基乙醇储存液则在 4℃保存。

在实验过程中，必须注意维持无菌条件的重要性。所有试剂和接触细胞的器具都必须保持无菌，使用前经无菌处理。

试剂

乙酸缓冲液，pH4.0，0.1mol/L（单元 10.5）

13.6g 乙酸三磷酸盐（终浓度 0.1mol/L）

29.22g NaCl（终浓度 0.5mol/L）

900ml 水

用乙酸调 pH 至 4.0

补加水至 1L

4℃保存 30d

乙酸缓冲液，pH5.0（单元 10.11）

0.2mol/L 乙酸钠（16.5g 无水合乙酸钠/L）

0.2mol/L 乙酸（11.4ml 冰乙酸/L）

上述溶液按 1∶1 混合，pH5.0

乙酸/EDTA 缓冲液，pH5.5（单元 1.6）

将冰乙酸加入 0.1mol/L 乙酸钠中，调 pH 至 5.5，然后加入 EDTA 至 3mmol/L。

酸性脂类标准品（单元 3.6）

磷脂酰丝氨酸（生物来源，非合成脂类）

磷脂酰丝氨醇（生物来源，非合成脂类）

油酸（可选）

双磷脂酰甘油（可选）

神经节苷酯（适量）

用 1∶2（*V/V*）氯仿/甲醇溶解 4 种油脂，溶液中含每种脂类浓度分别为 1、3、5、7μg/5μl。置于带聚四氟乙烯盖的玻璃管中，−20℃可保存数月。

制备 DRM 可以不加入双磷脂酰甘油；但配制标准品时可以选用双磷脂酰甘油。标准品中可以加入低浓度的非脂肪酸，包括油酸，也可以不使用这些酸类。如实验需要，酸性脂类可以从 Avanti Polar Lipids 公司或 Sigma 公司购买。

酸化高氯水（单元 10.4）

在 10L 水中加入 7ml HCl 和 2.5ml 氯漂白剂，盖紧，室温保存。

ACK 裂解缓冲液（单元 2.1、6.2、6.3、8.2、8.7、10.3 和 11.6）

8.29g NH_4Cl（0.15mol/L）

1g KH_2CO_3（10.0mmol/L）

37.2mg Na_2EDTA（0.1mmol/L）

加 800ml 水，用 1mol/L 盐酸调 pH 至 7.2～7.4

补加水至 1L

0.2μm 滤膜过滤除菌

室温保存

ACK 裂解液（单元 6.8）

1.66g NH_4Cl（终浓度 31mmol/L）

0.2g KH_2CO_3（终浓度 2mmol/L）

√加入 40μl 0.5mol/L EDTA（终浓度 20μmol/L）

补加水至 1L

室温保存一年

30%丙烯酰胺和 0.8%双丙烯酰胺（单元 12.3）

将 30.0g 丙烯酰胺和 0.8g *N*,*N*′-亚甲基双丙烯酰胺加入 100ml 水中。0.45μm 滤膜

过滤，4℃暗瓶中保存。30d后，当丙烯酰胺逐渐水解为丙烯酸和氨气时丢弃。

建议使用2×晶体级丙烯酰胺和双丙烯酰胺。可以购买晶体或再结晶体产品用于实验。

注意： 丙烯酰胺单体具有神经毒性。称量丙烯酰胺时必须戴口罩。配制溶液时必须戴手套，不能用嘴吸取溶液。

放线菌素D（AD）储存液，1mg/ml（单元4.1）

1mg 放线菌素D（放线菌素 C_1；Boehringer Mannheim）

50μl 完全乙醇，−20℃

混匀

√加入950μl 预冷的PBS

临用前4℃超声10min，或4℃放置24h以上

于4℃可保存1个月

AEC溶液（单元5.11）

在200μl *N*,*N′*-双甲基甲酰胺中溶解2.5mg氨乙基咔唑（AEC）。加入9ml 0.05mol/L乙酸钠、pH5.0和4μl 30%（*V*/*V*）H_2O_2，0.2μm滤膜过滤除菌，使用前新鲜配制。

AET溶液（单元8.2）

以12.5ml水溶解溴化二氨基乙基异硫脲，以4mol/L NaOH调pH至9.0，0.2μm滤膜过滤除菌，使用前新鲜配制。

乙醛品红染色液（单元10.6）

100ml 60%（*V*/*V*）乙醇

0.5g 盐酸化副品红

1ml 三聚乙醛

1.5ml 浓HCl

室温下放置2d

使用前以Whatman 1号试纸过滤

室温下可稳定保存7～10d

在作用于较陈旧标本时必须使用三聚乙醛而不是碱性乙醛。

碱性磷酸酶底物溶液（单元13.2）

对每一块微孔板，可选择下列两种底物缓冲液的一种，在10ml缓冲液中溶解10mg P-氮苯磷酸盐。使用前3h配制，避光保存。

0.1mol/L盐酸乙醇胺，pH9.8 /0.5mmol/L $MgCl_2$：85ml水中溶解1g盐酸乙醇胺。浓盐酸调pH至9.0。再加入50μl 1mol/L $MgCl_2$。室温保存一周或4℃保存一月。

0.1mol/L Na_2CO_3/0.5mmol/L $MgCl_2$：100ml水中溶解1.1g Na_2CO_3。加入50μl 1mol/L $MgCl_2$。密闭保存，室温保存一周或4℃保存一月。

碱性磷酸盐底物缓冲液（单元12.5）

√100mmol/L Tris·Cl，pH9.5

100mmol/L NaCl

5mmol/L $MgCl_2$

碱性转移缓冲液（单元 14.10）

0.4mol/L NaOH

1mol/L NaCl

室温保存一年

Alsever 溶液

20.5g 葡萄糖（114mmol/L）

7.9g 柠檬酸钠 · $2H_2O$（27mmol/L）

4.2g NaCl（71mmol/L）

补加水至 1L

1mol/L 柠檬酸调 pH 至 6.1，无菌过滤

4℃保存

7-氨基放射菌素 D（7-AAD）储存液，1mg/ml（单元 4.1）

1mg 7-AAD（Calbiochem 或 Sigma）

50μl 甲醇

混匀

加 950μl PBS

再次混匀

4℃，在避光保存一个月

使用前避光条件下配制 20μg/ml 工作液

抗体偶联的绵羊红细胞（EA）（单元 2.3）

以 PBS（见附录配方）洗涤 2.5ml 收集的绵羊红细胞（Alsever 液中提取；Cocalico）3 次，每次洗涤后均以 350g 离心 5min。然后用新鲜 PBS 稀释为 5%细胞悬浮液（10^9 个细胞/ml）。将高致敏的兔抗红细胞血清与 5%细胞悬液以 1∶50 稀释（可能形成亚凝集剂量的抗体）。室温下孵育 2h，偶尔温和地颠倒溶液。用 RPMI1640（Life Technologies）洗涤形成的 EA 3 次，随后以 PBS 将 EA 稀释为 5%细胞悬液。于4℃保存 2 周，使用前再以 RPMI 洗涤一次。

抗核染色质对照血清，高滴度（单元 10.11）

高滴度的抗核染色质对照血清须从成熟的自身免疫小鼠体内取血获得（如 5～6 月大的雌性 MRL/MpJ-Tnfrsf6^{lpr} 鼠；Jackson Laboratory）。ELISA 方法（见基本方案 1，单元 10.11）检测采集的小鼠血清，收集含最高 OD 值的个体血清，分装保存。采集非自身免疫小鼠（如 C57BL/6J）的血清作为对照。

检测缓冲液（单元 5.3）

1%（*m/V*）BSA

0.5mol/L NaCl

0.02mol/L Na_2HPO_4

0.05%（*m/V*）Tween 20

0.01%（*m/V*）乙基汞硫代水杨酸钠

以浓盐酸调 pH 至 6.5

4℃可保存 4 周

检测缓冲液（单元 5.6）

Dulbecco PBS（D-PBS，Life Technologies 等），含有：

1%（*m*/*V*）BSA

5%（*V*/*V*）FBS

1mol/L NaCl

4℃可保存 4 周

ATP 溶液（单元 3.3）

使用前，在冰上以 TPK 缓冲液（配方见附录）溶解 ATP 至浓度 1mmo/L。使用时，用稍多的 TPK 缓冲液稀释到工作浓度（如基本实验中需要稀释 100 倍）。

平衡盐缓冲液，见 BSS

BBS（硼酸盐缓冲液）（单元 1.1 和 1.7）

0.015mol/L $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$

0.12mol/L NaCl

以 NaOH 调 pH 至 8.5

BBS（单元 1.5 和 1.6）

0.015mol/L $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$

0.15mol/L NaCl

以 1mol/L NaOH 调 pH 至 8.5，过滤除菌

室温保存

BBS，pH8.4（单元 10.11）

0.025mol/L $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$

0.01mol/L H_3BO_3

0.075mol/L NaCl

室温可保存 2 个月

BBS-T（含 Tween 的 BBS）（单元 10.11）

8ml Tween 80（一氧化聚氧乙烯山梨糖）

√2L BBS

4℃可保存 3 个月

BBT（含 BSA 和 Tween 的 BBS）（单元 10.11）

8ml Tween 80（一氧化聚氧乙烯山梨糖）

10g 小牛血清（BSA），Fraction V（Fisher）

√2L BBS

4℃可保存 1 个月

BCIP/NBT 显色液（单元 12.5）

混匀 33μl NBT 储存液（100mg NET 溶解于 2ml 的 70% DMF 中，4℃下可保存 1 年）和 5ml 碱性磷酸酶底物缓冲液（见配方）。再加入 17μl BCIP 储存液（100mg BCIP 溶解于 2ml 的 70% DMF 中，4℃下可保存 1 年），混匀。室温下可稳定 1h。

BCIP/NBT 底物可从 Sigma、Kirkegaard&Perry、Moss 和 Vector Labs 等公司购买。

碳酸盐缓冲液，pH9.6（单元 13.3）

5.6g $NaHCO_3$（终浓度 67mmol/L）

3.5g Na_2CO_3（终浓度 33mmol/L）

900ml H_2O

以 1mol/L NaOH 调 pH 至 9.6

补加水至 1L

室温可保存 1～2 个月

结合缓冲液（单元 2.2）

√PBS，pH7.2～7.4

2%（V/V）FBS

100U/ml 青霉素（可选）

100μg/ml 链霉素（可选）

室温可保存 1 个月

封闭液（单元 13.2）

在 100ml PBST（见配方）中加入 1g BSA。采用卵白蛋白或奶粉代替 BSA，用作免疫反应中的载体蛋白。溶解时温和搅拌，0.45μm 滤膜过滤除菌。避光，4℃可保存 1 周。如长时间储存（如 1 月以上），需添加 0.01%（m/V）叠氮钠。

常用的封闭液浓度在 1%～5%（m/V）。也可以购买商品化的封闭缓冲液。

封闭缓冲液（单元 1.1）

√BBS，加入：

0.05% Tween 20

1mmol/L EDTA

0.25%（V/V）BSA

0.05%（m/V）NaN_3

4℃保存

明胶可以代替 BSA；5%速溶奶粉也可以替代 BSA，但可能导致抗体非特异性结合。

封闭缓冲液（单元 12.5）

用于比色测定：

用于硝化纤维和 PVDF：使用 TTBS 液（见配方）。

用于中性和带正电的尼龙膜：Tris 缓冲液（TBS，见配方），含 10%（m/V）脱脂奶粉。使用前配制。

用于荧光检测：

用于硝化纤维、PVDF 和中性尼龙膜：TTBS（见配方），含 0.2%（m/V）酪蛋白。使用前配制。

用于带正电的尼龙膜：TTBS（见配方），含 6%（m/V）酪蛋白、1%（V/V）聚乙烯吡咯（PVP）。连续搅拌，将酪蛋白、聚乙烯吡咯加入预热（65℃）的 TTBS。搅拌 5min。冷却。使用前配制。

封闭液（单元 3.2）

√10mmol/L Tris·Cl，pH8.0

150mmol/L NaCl

2%（*m/V*）BSA fraction V（ICN Biomedicals）

0.02%（*V/V*）NaN_3

室温保存

封闭液（单元 5.3）

Dulbecco PBS（D-PBS），含有：

3%（*m/V*）BSA

0.01%（*m/V*）硫柳汞

4℃可保存 4 周

封闭液（单元 14.10）

100mg 封闭试剂（Amersham）

2ml 马来酸（0.5mol/L）

加热至 40℃，使用前以 1mol/L NaOH 调 pH 至 7。4℃可稳定保存 6 个月以上。

BM-cyclin 溶液 1 和 2（附录 3D）

45μm 滤膜过滤 BM-cyclin 溶液 1 和 2（Boehringer Mannheim）。分装，－20℃保存，使用前解冻。

频繁解冻、冻存不会显著影响抗体活性。

硼酸盐缓冲液，参见 BBS

Brewer 鸟嘌呤培养基，3%（单元 6.1）

双蒸水配制 3%（*m/V*）Brewer 鸟嘌呤培养基。溶液加热至沸腾，高压灭菌。室温可保存 6 个月。溶液出现混浊（提示有细菌污染）后，丢弃溶液。

BSS（平衡盐溶液）（单元 3.1）

135mmol/L NaCl

5mmol/L KCl

1mmol/L Na_2HPO_4

5.6mmol/L 葡萄糖

1mmol/L $CaCl_2$

0.5mmol/L $MgCl_2$

10mmol/L HEPES，pH7.4

0.1%（*m/V*）BSA

BSS（平衡盐溶液）（单元 6.6）

储存液 I（10×）

10g 右旋葡萄糖或 11g 水合右旋葡萄糖

0.6gKH_2PO_4

3.58g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 或 1.85g 无水合 Na_2HPO_4

20ml 5%酚红（GIBCO/BRL）

补加水至1L

分装为500μl一份

4℃可稳定保存6个月左右

储存液II（10×）

1.86g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

4g KCl

80g NaCl

2g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 或1.04g无水 $MgCl_2$

2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

补加水至1L

分装为500μl一份

4℃可稳定保存6个月左右

取1份储存液I、8份蒸馏水和1份储存液II混合。无菌过滤，4℃可保存1个月，溶液pH不变（不变色），也不会有细菌污染。注意在室温下取出溶液使用前要检测，当溶液pH在7.0左右、电导率约为16时方可使用（配制1×缓冲液时进行检测）。

BSS（缓冲盐溶液）（单元3.6）

20mmol/L HEPES，pH7.4

135mmol/L NaCl

5mmol/L KCl

1.8mmol/L $CaCl_2$

1mmol/L $MgCl_2$

5.6mmol/L 葡萄糖

4℃可保存1个月

BSS，见Mishell-Dutton BSS

缓冲液A（单元3.5）

√50mmol/L Tris·Cl，pH8.0

5mmol/L 2-ME

使用前配制

缓冲液B（单元3.5）

40mmol/L HEPES，pH7.4

5mmol/L $MgCl_2$

0.1mmol/L EGTA

4℃可保存1年

使用前加入：2mmol/L二硫苏糖醇（DTT；配成2mmol/L储存液，分装后−20℃保存）。

缓冲液D（单元3.5）

20mmol/L HEPES，pH7.4

20%（V/V）甘油

√0.2mmol/L EDTA

0.1mol/L KCl

4℃可保存 1 年

使用前加入：

0.5mmol/L 二硫苏糖醇（DTT；配成 2mmol/L 储存液，分装后－20℃保存）

0.5mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF；Sigma；配成 100mmol/L 储存液，分装后－20℃保存）

缓冲液 X（单元 3.5）

√20mmol/L Tris · Cl，pH7.4

1mol/L NaCl

√0.2mmol/L EDTA

0.2mmol/L EGTA

4℃可保存 1 年

使用前加入：

0.5mmol/L 二硫苏糖醇（DTT；配成 2mmol/L 储存液，分装后－20℃保存）

0.5mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF；Sigma；配成 100mmol/L 储存液，分装后－20℃保存）

5μg/ml 长春碱（Sigma；配成 10mg/ml 储存液，分装后－20℃保存）

5μg/ml 偶联试剂（Sigma；配成 10mg/ml 储存液，分装后－20℃保存）

甲醛-丙酮固定液（附录 3D）

将 20mg Na_2HPO_4 和 100mg KH_2PO_4 溶解于 30ml 蒸馏水中。加入 45ml 丙酮和 25ml甲醛，混匀，冻存。最终溶液 pH 约为 6.6。

苯酚缓冲液（单元 14.2）

在放置搅拌子的 2L 烧杯内加入 0.5g 八水合木糖醇。慢慢注入 500ml 软化的苯酚或融化的再蒸馏苯酚（65℃水浴）。因为八水合木糖醇的作用，苯酚逐渐变黄。再加入 500ml 50mmol/L 的 Tris 碱，盖上铝膜，室温下低速搅拌 10min，待液相分离。慢慢将顶层液相（水相）倒入废液缸内，用 25 ml 吸管和吸球吸去不能倒出的水相。用 500ml 的 Tris · Cl，pH8.0（配方见附录）洗涤两遍以上。用试纸检测苯酚（底层黄色液相）pH，直至 pH 达到 8.0 为止。加入 250ml 150mmol/L Tris · Cl，pH8.0 或 TE 缓冲液 pH8.0（配方见附录），置于棕色瓶或带铝膜的玻璃瓶内，4℃可保存 2 个月。

注意：苯酚能严重灼伤皮肤。操作苯酚时必须戴手套、防护眼镜并穿上工作服，所有操作必须在通风橱中进行。

缓冲盐溶液，见 BSS

$CaCl_2$，2mol/L（单元 14.1）

147g $CaCl_2$（双水合）（Mallinckrodt）

加水至 500ml

0.2μm 滤膜（Nalgene）过滤除菌

分装，－20℃保存

二甲砷酸盐缓冲液，0.28mol/L（单元 2.5）

19.32g 二甲砷酸（相对分子质量 138）

300ml 水
以 10mol/L NaOH（约 200 滴）调 pH 至 6.9
补加水至 500ml
室温可保存数月

碳酸品红溶液（单元 10.1）

3ml 88%苯酚
5ml 100%乙醇
0.5g 副品红
补加水至 50ml
室温保存
该液体染色效果持久，使用时需当心。

氨甲酰基胆碱缓冲液，1mol/L（单元 10.5）

182.6g 氨甲酰基胆碱
1.21g Trizma
0.065g NaN_3
1ml Triton X-100
补加水至 1L
4℃可保存 30d

碳酸盐缓冲液

1.6g Na_2CO_3（15mmol/L）
2.9g $NaHCO_3$（35mmol/L）
0.2g NaN_3（3.1mmol/L）
补加水至 1L
调 pH 至 9.5

碳酸盐包被缓冲液（单元 5.7）

1.59gNa_2CO_3（0.015mol/L）
2.93g $NaHCO_3$（0.035mol/L）
加水至 900ml
以 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调 pH 至 9.6
补加水至 1L
每周新鲜配制

碳酸盐包被缓冲液，50mmol/L（单元 14.3）

0.68g Na_2CO_3
3.7g $NaHCO_3$
加水至 1L（pH9.6）
高压灭菌
室温保存 1 年

α-酪蛋白，1mg/ml（单元 3.3）

√10mmol/L Tris · Cl

1mg/ml α-酪蛋白

煮沸 10min，冷却至室温

0.45μm 滤膜过滤除菌

细胞裂解缓冲液（单元 9.5）

0.001%（V/V）Triton X-100

0.0001%（m/V）SDS

√10mmol/L Tris·Cl，pH8.0

√1mmol/L EDTA

分装，4℃保存

细胞染色液（单元 11.5）

以 20%乙醇配制 1%（m/V）的结晶紫储存液（室温下可保存 1 年）。临用前与 Milli-Q 水以 1∶9 稀释。

细胞悬浮缓冲液（单元 14.10）

100ml：

√1ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.5

400ml NaCl（5mol/L）

√20μl EDTA（0.5mol/L）

78.6ml H_2O

室温可保存 1 年

CFSE 溶液（单元 2.9）

用二甲基亚砜配制 5mmol/L 5-(6-)羧基荧光素二乙酸盐琥珀酯（CFSE；Molecular Probes）。分装为适当体积一份，－20℃保存。

冻存的储存液在融化后即可使用。如实验需要浓度低于 5mmol/L 的 CFSE 液可在使用前配制，不必冻存。

氯仿/甲醇（单元 10.1）

将氯仿和甲醇按 2∶1（V/V）混匀，室温下搅拌 1h 以上。贮藏于密封的玻璃瓶中，室温下保存于化学通风橱中。

氯仿/甲醇/1%乙酸（单元 10.1）

将氯仿和甲醇按 2∶1（V/V）混匀，再加入 1%冰乙酸（V/V）。室温，搅拌 1h 以上。贮藏于密封的玻璃瓶中，室温下保存于化学通风橱中。

胆酸盐缓冲液，0.2%（单元 10.5）

2g 胆酸钠

0.65g NaN_3

√10mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.5，补足至 1L

调 pH 至 7.5

于 4℃可保存 30d

盐酸环丙沙星，10mg/ml（附录 3F）

用水配制 10mg/ml 的盐酸环丙沙星（Sigma）。0.45μm 滤膜过滤除菌，分装，－20℃冻存。

柠檬酸/磷酸缓冲液（单元 15.1）

131mmol/L 柠檬酸

124mmol/L Na_2HPO_4

150mmol/L NaCl

调 pH 至 6.5

−20℃保存 1 年

Click 培养基，见 Click 完全培养基

4CN 显色液（单元 12.5）

混匀 20ml 冰预冷的甲醇和 60mg 4-氯萘酚（4CN）。另外将 100ml TBS（见附录）与 60μl 30%（*V/V*）H_2O_2混合。使用时迅速混匀上述两种液体。

CNBr/乙腈（单元 12.2）

将 25g 溴化氰加入 50ml 乙腈中，终浓度 62.5%（*m/V*）。−20℃保存于干燥器内。使用前可预热。

注意：CNBr 是剧毒物质，必须在通风橱中操作。

包被缓冲液（单元 5.3、5.11、8.10 和 8.11）

A：8.4g $NaHCO_3$/100ml H_2O（终浓度 1mol/L）

B：10.6g Na_2CO_3/100ml H_2O（终浓度 1mol/L）

取 45.3ml A 液与 18.2ml B 液混合，并加水补足至 1L。根据所需，用 A 液或 B 液调 pH 至 9.5（单元 5.3）或 9.6（其他单元）。室温保存。

包被介质（单元 8.3）

√含 Ca^{2+}、Mg^{2+}或品红的 HBSS

10%FBS，热灭活（56℃ 1h，Biofluids）

20mmol/L HEPES（GIBCO/BRL）

胶原酶 D，4000 Mandl U/ml（单元 2.3）

产品的活性按 Wünsch 单位列出（1Wünsch 单位＝750Mandl 单位），每批产品的活性均有不同。将胶原酶 D（Boehringer Mannheim）溶解于含 Ca^{2+}、Mg^{2+}或品红的 HBSS 中，终浓度 4 000Mandl U/ml：

$$\text{ml/包装}=\frac{\left(\frac{x\text{Wünsch U}}{\text{mg}}\right)\times\left(\frac{750\text{Mandl U}}{\text{Wünsch U}}\right)\times\left(\frac{1000\text{mg}}{\text{包装}}\right)}{\frac{4000\text{Mandl}}{\text{U/ml}}}$$

式中，x 是产品的比活性数值。以一个 115ml 的过滤装置过滤溶液，得到微褐色的溶液，分装成 2.2ml 一份，−20℃冻存。一份可用于 20 个脾脏实验。

柱储存液（单元 12.1）

配制 TSA 溶液（见配方），加入 1mmol/L EDTA 和 20μg/ml 庆大霉素，或 0.01%硫柳汞（Aldrich）。

柱洗脱液（单元 10.5）

1.21g Tris 碱

0.065g NaN_3

1ml Triton X-100

补加水至 1L

4℃可保存 30d

Click 完全培养基

Click 培养基（Irvine Scientific），含有：

5%、10%或 20%的 FBS，56℃，1h 热灭活

2mmol/L L-谷氨酰胺

50μmol/L 2-ME

100U/ml 青霉素

100μg/ml 硫酸链霉素

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

DMEM 完全培养基

DMEM，高糖型，含有：

5%、10%或 20%的 FBS，56℃，1h 热灭活

1% 非必需氨基酸

2mmol/L L-谷氨酰胺

50μmol/L 2-ME

100U/ml 青霉素

100μg/ml 硫酸链霉素

含 4500mg/L 的右旋葡萄糖的 DMEM 可从 Life Technologies 购得。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

含添加物的 DMEM 培养基（单元 2.12）

4500mg/L DMEM，高糖型

√5%～20%（V/V）热灭活的 FBS

10mmol/L 3-(N-吗啉代）丙磺酸（MOPS）

50μmol/L 2-ME（以 Life Technologies 的 Dulbecco PBS 配制 100×储存液）

100U/ml 青霉素

100μg/ml 硫酸链霉素

216mg/L L-谷氨酰胺（终浓度 1.5mmol/L）

116mg/L L-精氨酸（终浓度 0.7mmol/L）

36mg/L L-天门冬酰胺（终浓度 0.3mmol/L）

6mg/L 叶酸（终浓度 14μmol/L）

110mg/L 丙酮酸钠（终浓度 1mmol/L）

2g/L $NaHCO_3$（终浓度 25mmol/L）

如果 DMEM 中包含丙酮酸钠或其他物质，请注意精确调节体积。注意不要加入 10%热灭活的 FBS 底层血清，因为其常含有沉淀。HEPES（25mmol/L）可代替 MOPS，但其缓冲范围较 MOPS 为小。氨基酸、叶酸、混合抗生素均可配制成 100×储存液，在配制 DMEM 时加入。两周后需加入 L-谷氨酰胺以补充流失。补充的 $NaHCO_3$ 浓度必须与孵箱中的 CO_2 浓度相符。培养基要避免光照和 UV 照射以免产生毒性产物。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

IF12 完全培养基（单元 2.5、2.6）

1∶1（*V*/*V*）混匀 IM DMEM（Invitrogen）与 Ham F12 溶液（Invitrogen）：

10%（*V*/*V*）FBS

2mmol/L 谷氨酰胺

50μg/ml 庆大霉素

50μmol/L 2-ME

5μg/ml 牛胰岛素

5μg/ml 转铁蛋白

20μmol/L 黄体酮

4℃保存 2～3 周

IF12 是一种营养非常丰富的培养基，特别适于 B 细胞增殖和分化。谷氨酰胺是一种不稳定的物质，需每隔两周补充一次。要仔细检查 FBS 的批次质量，以保证效能而减少背景干扰。Hyclone 和 Atlanta Biologicals 可以提供高质量的血清产品。使用 10% FBS 可以不加入胰岛素、转铁蛋白和黄体酮；但使用 0～5%的 FBS 时必须加入这些成分。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

IMDM 完全培养基

IMDM 培养基，含有：

5%、10%、20%FBS，56℃，1h 热灭活

2mmol/L L-谷氨酰胺

50μmol/L 2-ME

100U/ml 青霉素

100μg/ml 硫酸链霉素

含谷氨酰胺和 25mmol/L HEPES 的 IMDM 可以从 Life Technologies 购买。此培养基也是一种营养丰富的基质，尤适于高敏感细胞的快速增殖。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

完全培养基（单元 11.3）

含 Earle 平衡盐的最少必需培养基（MEM），或 Dulbecco 最少必需培养基（DMEM）：

5%～10%（*V*/*V*）FBS，56℃ 1h 热灭活

2mmol/L L-谷氨酰胺

100U/ml 青霉素

100μg/ml 硫酸链霉素

4℃可保存 4 周

用于滴定器官匀浆时，需加入 0.2mg/ml 庆大霉素和 2.5μg/ml 两性霉素 B。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

199 完全培养基（C-M199）（单元 11.1）

√100ml 热灭活的 FBS

取 5ml 10mmol/L 腺嘌呤（相对分子质量 171.6）加入 50mmol/L HEPES 酸中

1ml 0.25%（m/V）血晶素加入 50%（V/V）三羟乙胺

5ml 100×青霉素/链霉素/L-谷氨酰胺（Biofluids）

389ml 1× M199 包含 Hank 盐和 25mmol/L HEPES 酸（Life Technologies）

4℃可保存 4 周

在 M199 的添加剂中，只有 FBS 是至关重要的。新鲜批次的 FBS 能够支持高密度的细胞培养。

腺嘌呤和血晶素储存液 4℃下可保存 6 个月。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

2×199 完全培养基（C-M199）（单元 11.5）

100ml 2×含 Earle 平衡盐的 199 培养基（Life Technologies）

10ml FBS，热灭活

2ml 100×L-谷氨酰胺（Life Technologies）

2ml 100×青霉素/链霉素（Life Technologies）

2×199 完全培养基即是 10%FBS 和 2×其他相关成分配制而成。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

RPMI 完全培养基

RPMI 1640 培养基（Life Technologies），含有：

2%、5%、10%、15%或 20% FBS，56℃热灭活 1h

2μmmol/L L-谷氨酰胺

50μmol/L 2-ME

100U/ml 青霉素

100μg/ml 硫酸链霉素

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

RPMI-5 完全培养基（单元 2.3）

RPMI 1640 培养基（Life Technologies），含有：

5% FBS，56℃热灭活 1h

10mmol/L HEPES

20μg/ml 硫酸庆大霉素（Life Technologies）

50μmol/L 2-ME

过滤除菌

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

RPMI-10 完全培养基（单元 2.5）

配制 RPMI 完全培养基（见配方），加入：

10%（V/V）FBS

1mmol/L 丙酮酸钠

50μg/ml 庆大霉素

10mmol/L HEPES

4℃可保存 2 周

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

RPMI-10AB、-30AB 完全培养基（单元 8.19）

RPMI1640 培养基（Life Technologies），含有：

10%或 30%（V/V）人 AB 血清（Sigma 或 ICN Biochemicals），56℃热灭活 1h

100U/ml 青霉素

100μg/ml 硫酸链霉素

4℃可保存 1 个月

使用前 0.22μm 滤膜过滤除菌

无需加入 L-谷氨酰胺或 2-ME。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

RPMI-10 完全培养基，黏膜细胞用（单元 8.17）

860ml RPMI 1640 培养基（Life Technologies）

100ml FBS [终浓度 10%（V/V）]

15ml 1mol/L HEPES（终浓度 15mmol/L）

25ml 100× 抗生素/抗真菌溶液（Life Technologies；终浓度 2.5×）

4℃可保存 1 个月

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

RPMI-2、-10 完全培养基，NK 细胞用（单元 8.6 和 8.14）

RPMI 1640 培养基（Life Technologies），含有：

2%或 10%（V/V）FBS，56℃热灭活 45min

2mmol/L L-谷氨酰胺

25mmol/L HEPES 缓冲液

50μg/ml 硫酸链霉素

500ng/ml 两性霉素 B

100U/ml 青霉素

4℃可保存 4 周

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

偶联缓冲液（单元 5.6）

Dulbcco PBS（D-PBS；Life Technologies），含有：

1%（m/V）BSA

5%（V/V）FBS

0.1%（m/V）3-3-(胆胺丙基)- 二甲氨基-丙磺酸（CHAPS）

0.3mol/L NaCl

4℃可保存 2 周

考马斯亮蓝染色液（单元 12.4）

50%（V/V）甲醇

0.05%（m/V）考马斯亮蓝 R-250（Bio-Rad 或 Pierce）

10%（V/V）乙酸

40%水

以甲醇溶解考马斯亮蓝 R-250，然后加入乙酸和水。室温下可保存 6 个月。如溶液

因长期储存出现沉淀，可过滤处理。

考马斯染料（单元 3.5）

25%（*V*/*V*）异丙醇

7%（*V*/*V*）乙酸

0.05%（*m*/*V*）考马斯亮蓝（Sigma）

室温可保存 1 年

偶联缓冲液（单元 10.5）

1.36g 碳酸钠（终浓度 0.01mol/L）

7.35g 碳酸氢钠（终浓度 0.09mol/L）

0.5mol/L 氯化钠

950ml 水

以 1mol/L HCl 调 pH 至 8.3

补加水至 1L

4℃可保存 30d

CPRG，10×（9.7 单元）

将氯酚红-β-D-半乳糖苷（CPRG，Roche Molecular Biochemical）溶解于 Z 缓冲液（见配方）中，溶液终浓度 80mmol/L（于－20℃可保存数月）。

T 细胞系培养基（单元 8.15）

使用本培养基（Yssel 培养基），并补充 1%人 AB^+ 血清（Yssel *et al*., 1984）可获得良好的 T 细胞培养效果。

IMDM（Life Technologies，液体培养基，包含 L-谷氨酰胺、25mmol/L HEPES，但没有 α-巯基乙醇），依次加入：

0.25%（*m*/*V*）BSA（Sigma）

1.8mg/L 2-甲基乙醇（Sigma）

40mg/L 转移因子（Holo form；Boehringer Mannhein）

5mg/L 牛胰岛素（Sigma），用 0.01mol/L HCl 稀释 1mg/ml 的浓缩液配制

2mg/L 亚油酸（Sigma）和自由酸（Sigma），分别用它们新鲜配制的 20mg/ml 储存液稀释配制

青霉素/链霉素（Invitrogen 0.2μm 滤膜过滤）

分成 50ml 一份

－80℃可保存 2 个月

使用前加入 1%人 AB^+ 血清

首先配制 11×浓缩的含添加剂的溶液，过滤，一并储存于 50ml 的试管中，或加入 500ml 的瓶中，－80℃保存。人 AB^+ 血清 5ml 也可以加入保存。

如实验要求去除内毒素，BSA 制剂则要换成无内毒素的 BSA 制剂（Sigma），或人血清白蛋白（Sigma）。在常规培养基中培养的 T 细胞克隆，可先以此培养基洗涤，然后再以本培养基培养 18h 后用于无内毒素实验。

Holo 和 Apo 两种转移因子都可以使用，但由于它们对 T 细胞生长作用效果不同，所以应在实验开始前进行试用。转移因子制剂包含人 Ig 会影响实验本底中抗体的产生，

尤其是IgE的产生。此时需使用无Ig的转移因子（Pierce Chemical）。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

DAB/$NiCl_2$ 显色液（单元12.5）

√5ml 100mmol/L Tris · Cl，pH7.5

100μl 40mg/ml 二氨基联苯胺（DAB；100μl一份，−20℃保存）

25μl 80mg/ml $NiCl_2$（100μl一份，−20℃保存）

15μl 3% H_2O_2

使用前混匀

注意：操作DAB需谨慎，戴手套和护具；DAB是剧毒物质。

反应底物可从Sigma、Kirkegaard&Perry、Moss和Vector Labs等公司购买。

DAPI-Vectashield染液（单元14.10）

配制200mg/ml的储存液（置于暗处，4℃可保存2个月以上）

进行DNA染色，须在使用前迅速将5ml DAPI储存液加入到1ml Vectashield（Vector Labs）中。

DCPCR扩增缓冲液，10×（单元14.4）

500mmol/L KCl

√100mmol/L Tris · Cl，pH8.3

√2mmol/L 4dNTP混合液

分装为0.5ml一份，−20℃保存

本方案中储存于DCPCR管中的连接混合物的最佳浓度是1.5mmol/L，溶液已包含$MgCl_2$，所以无需另外加入$MgCl_2$。在其他实验条件下，必须精确计算$MgCl_2$的含量，以保证PCR反应获得最佳的效果。

变性缓冲液（单元14.10）

1.5mol/L NaCl

0.5mol/L NaOH

室温可保存1年

变性裂解缓冲液（单元12.2）

1%（*m/V*）SDS

√50mmol/L Tris · Cl，pH7.4

√5mmol/L EDTA

室温可保存1周

使用前加入以下成分：

10mmol/L苯甲基磺酰氟（PMSF；100mmol/L一份，储存于100%乙醇中，−20℃可保存6个月）

2μg/ml亮抑酶肽（以水配制10mg/ml的储存液，−20℃可保存6个月）

15U/ml DNA酶Ⅰ（配制15 000U/ml储存液，−20℃可保存2年）

以水配制0.1mol/L的4-(2-氨基）甲苯苯磺酰氟（AEBSF）储存液，临用前稀释到1mmol/L，可替代PMSF。AEBSF在−20℃条件下可保存1年。

Denhardt 溶液，100×

10g Ficoll 400

10g 多聚乙烯吡咯烷酮

10g BSA（Pentax Fraction V，Mils Laboratories）

补加水至 500ml

过滤，分装为 25ml 一份，－20℃保存。

高密度 BSA 溶液（单元 2.3）

在 1L 容量瓶中，加入 186ml PBS（见配方），29ml 1mol/L NaOH，65ml 水（小心操作，注意液体不要在瓶内飞溅）。不要搅拌，将 106g BSA（Cohn fraction V，推荐采用完全 BSA）铺在溶液表面，盖上锡纸，冷藏过夜，使 BSA 慢慢溶解。

第二天，温和摇晃已变为澄清、微褐色的溶液；测量折射指数，精确到小数点后第四位。25℃条件下，正确密度的 BSA（1.080g/ml）的折射指数在 1.384～1.385。为校正 BSA 浓度，加入 1.5g BSA 或 5ml PBS 以增或减折射指数，每次可调整约 0.005。校正折射指数后，用试纸检测 pH。pH 应在 7.0～7.4，一般无需调整。

无菌过滤溶液。将 47mm 滤膜（Millpore type）置于一个 500ml 的过滤装置（Nalgene＃156-4045）顶部，先以少量 BSA 润湿滤膜。真空抽滤数分钟，直到 BSA 滤出为止。取下真空泵，小心将剩余的 BSA 溶液加入滤器上部的储存器中（避免起泡沫。使用真空泵和滤器过滤剩余的 BSA，≥10min）。4℃可保存 3 个月。

DEPC 处理的溶液（单元 1.8，第十四章）

将 0.2ml 焦碳酸二乙酯加入到 100ml 待处理溶液中。用力摇晃以溶解 DEPC。高压处理。避免有 RNA 污染的试管等污染。

注意：操作 DEPC 时必须戴手套，在通风橱中进行；DEPC 可能是致癌物。

DEPC 处理的水（单元 9.5）

将 200μl DEPC（Fluka＃32490）加入到 1L 过滤双蒸水中，用力摇晃以溶解 DEPC。高压 15min 灭活 DEPC。4℃保存。

注意：操作 DEPC 时必须戴手套，在通风橱中进行；DEPC 可能是致癌物。

抗抗体混合剂（单元 10.8）

100μg 大鼠抗小鼠 B220 单克隆抗体（RA3-6B2；Coffman，1982）

100μg 大鼠抗小鼠 CD8 单克隆抗体（TIB 210；ATCC）

100μg 大鼠抗小鼠 CD11b（抗 Mac-1）单克隆抗体（TIB 218；ATCC）

√10ml PBS/BSA

4℃可保存 2 个月

组织培养上清，腹水或纯化的免疫球蛋白均可作为抗体来源。虽然上述配方中抗体浓度已达到饱和，但仍建议在实验中先采用滴定法检测抗体效价。

脱色液（单元 3.5）

5%（*V*/*V*）异丙醇

7%（*V*/*V*）甲酸

室温可保存 1 年

非变性裂解缓冲液（单元 12.2）

√PBS 中，含有：

√5mmol/L EDTA

0.02%（*m*/*V*）NaN_3

4℃可保存 6 个月

使用前加入：10mmol/L 碘代乙酰胺（粉末）

1mmol/L PMSF（储存于 100%乙醇中，−20℃可保存 6 个月）

2μg/ml 亮抑酶肽（以水配制的 10mg/ml 的储存液，−20℃可保存 6 个月）

以水配制 0.1mol/L 的 4-(2-氨基）甲苯苯磺酰氟（AEBSF）储存液，临用前稀释到 1mmol/L，可替代 PMSF。AEBSF 在−20℃条件下可保存 1 年。

变性储存液（单元 12.1）

以水配制 10%（*V*/*V*）Triton X-100 或 5%（*V*/*V*）去氧胆酸酯。Millipore 滤器过滤除菌。室温下可保存 5 年；Triton X-100 需在暗处保存。

NP-40 可以代替 Triton X-100。

显影液（单元 3.2）

√0.1mol/L Tris · Cl，pH9.5

0.1mol/L NaCl

5mmol/L $MgCl_2$

66μl/10ml NBT 底物（0.4mmol/L；Promege）

33μl/10ml BCIP 底物（0.4mmol/L；Promege）

使用前配制

显影液（单元 12.4）

0.5g 柠檬酸钠

0.5ml 37%甲醛（Kodak）

补加水至 100ml

室温可保存 1 个月左右

显影液（单元 13.3）

用 6ml 水溶解 10mg 联苯二胺（Sigma）（终浓度 0.33mol/L ）。加入 25μl 3% H_2O_2（终浓度 0.012%）。新鲜配制。

透析缓冲液（单元 4.1）

√0.1mol/L Tris · Cl，pH7.4

0.1%（*m*/*V*）NaN_3

0.2mol/L NaCl

以 NaOH 调 pH 至 7.4

室温可保存 1 周

透析的血清（单元 3.6）

取 10ml 左右的血清，以 PBS，pH7.4（见配方）透析。每次更换 1L，4℃下透析 24h，换液 3 次，每次 1L。透析袋截留相对分子质量为 12 000～14 000。透析的血清可在 4℃保存 1 周，或在−20℃保存 1 年。

二乙醇胺，0.01mol/L（单元10.11）

1.918ml二乙醇胺（Sigma）

1.9L蒸馏水

12mol/L HCl调pH至9.8

终体积2L

4℃可保存3个月

操作必须在化学通风橱中进行。可在37℃预热以便于溶解试剂，但温度不能超过56℃。

稀释缓冲液（单元12.2）

√TSA溶液，含有：

0.1% Triton X-100（室温，暗处保存）

0.1%牛白蛋白（冻存）

双环氧丙烷磷酸酶底物缓冲液（单元12.5）

1mmol/L $MgCl_2$

0.1mmol/L二乙醇胺

0.02（m/V）叠氮钠（可选）

以HCl调pH至10，新鲜配制

通常，AMPPD底物缓冲液中包含1mmol/L $MgCl_2$，50mmol/L碳酸钠或双碳酸钠，pH9.6（Gillesie and Hudspeth，1991）。使用二乙醇胺可以得到更好的效果（Tropix Western light instructions）。

此外，还可以使用100mmol/L Tris·Cl（pH9.5）/100mmol/L NaCl/5mmol/L $MgCl_2$（Sandhu *et al.*，1991）。

双环氧丙烷磷酸显色液（单元12.5）

用双环氧丙烷磷酸酶底物缓冲液配制0.1mg/ml AMPPD（Tropix），CSPD（Tropix）或Lumigen-PPD（Lumigen）底物。临用前配制。Lumi-Phos 530（Boehringer Mannheim或Lumigen）溶液可预先配制，直接应用于膜上。

Tropix Western light方法中，AMPPD底物浓度的最小推荐剂量是240μmol/L。也可以使用稀释10倍之内的显色液，但需要延长曝光时间。

直接PCR扩增缓冲液，10×（单元14.4）

500mmol/L KCl

√100mmol/L Tris·Cl，pH8.3

0.01%（m/V）凝胶

12mmol/L $MgCl_2$

5%（V/V）甘油

√2mmol/L 4dNTP混合液

分装为0.5ml一份，于−20℃保存

不连续Ficoll-Hypaque梯度分离液（单元8.14）

为形成密度梯度，将10～12ml 100% Ficoll-Paque（Pharmacia Biotech）加入50ml塑料离心管中。取1份RPMI1640培养基和3份100% Ficoll-Paque（加在上层），配成

75%的 Ficoll-Paque 混合液，然后慢慢将 10～12ml 75% Ficoll-Paque 混合液加入到 100%Ficoll-Paque 液的顶层。避免液体相混。临用前制备，不要储存。

DMEM，见 DMEM 完全培养基

DNA 上样缓冲液，6×（单元 14.10）

0.25%（*m*/*V*）溴酚蓝

0.25%（*m*/*V*）二甲苯铵 FF

30%（*V*/*V*）甘油

4℃可保存 1 年

DNase I 溶液（单元 2.8）

在 4.2mmol/L $MgCl_2$/0.15mol/L NaCl、pH5 的缓冲液中溶解脱氧核糖核酸酶 I（牛胰腺来源 Sigma），终浓度 50Kunitz U/ml。使用前新鲜配制，或配制浓缩液（500U/ml），于－20℃可保存 2 个月。

DNase/胶原酶 P 工作液（单元 10.6）

√8ml HBSS 补充液

1ml 0.1mg/ml DNase（牛胰腺来源 Sigma）加入 HBSS 补充液中（分装为 1ml 一份，－20℃保存）

1ml 40mg/ml 胶原酶 P（Boehringer Mannheim）加入 HBSS 补充液中（分装为 1ml 一份，－20℃保存）

新鲜配制，冰上操作

10ml 工作溶液能用于大约 3 只小鼠胰腺细胞的分离。

脱氧核苷酸混合剂（单元 9.5，单元 14.4～14.8）

以 TE 缓冲液、pH7.5（见配方）配制 4 种 dNTP 溶液，然后混合 4 种溶液。例如，配制 2mmol/L 脱氧核苷酸混合物，包含了 2mmol/L dATP、dCTP、dGTP 和 dT-TP 各一份。分装为 1ml 一份，－20℃保存 1 年。

例如，配制 25mmol/L 脱氧核苷酸混合物：取 4 种 100mmol/L dNTP（Promega）溶液等体积混合而成。分装为 1ml 一份，－20℃保存 1 年。

DPBS（Dulbecco 磷酸盐）（单元 2.5 和 2.12）

缓缓加入 100ml 1mg/ml $GaCl \cdot 2H_2O$ 到 300ml 水中。再缓缓加入 100ml 的 1mg/ml $MgCl_2 \cdot 6H_2O$，混匀。最后，再缓缓加入 500ml PBS 补充液（见配方），混匀。4℃可保存 3 个月。

必须按本操作规范依次加入试剂，溶液最终 pH 为 7.2。也可以购买含钙和镁的 DPBS 产品（如 Life Technologies）。

DTT（二硫苏糖醇），1mol/L

1.55g DTT

10ml 水

过滤

分装，－20℃冻存

DTT，1mol/L（单元 9.5）

将 5g DTT（Fluka#43817）溶解于 27ml 经 DEPC 处理的水溶液中（见配方）。可

以 37℃温热溶液底部，以充分溶解 DTT 粉末。

Dulbecco 磷酸盐，见 DPBS

染料混合剂（单元 2.14）

√1ml PBS

50μg/ml 吖啶橙（Sigma）

50μg/ml 溴乙啡啶（Sigma）

4℃可保存 6 个月

EBSS，见含添加物的 EBSS

EDTA，0.5mol/L，pH8.0

用 700ml 水溶解 186.1g 乙二胺四乙酸（EDTA；二钠盐；双水合）。溶解前，以 10mol/L NaOH（约 50ml）慢慢调 pH 至 8.0。补加水至 1L，过滤除菌。

如果溶液 pH 上升到 7～8，此浓度下的 EDTA 难以溶解。

EDTA/HBSS 溶液（单元 8.17）

用 800ml HBSS 溶解 3.72g EDTA。以 NaOH 调 pH 至 7.2，加入 HBSS 至 1000ml（终浓度 10mmol/L）。过滤除菌。于室温可保存 3 个月，临用前，与无菌 HBSS 按1∶9 稀释（终浓度 1mmol/L）。

ELISA 洗液（单元 5.7）

配制 10×储存液：

0.49g NaH_2PO_4（一水合；0.004mol/L）

15.08g Na_2HPO_4（一水合；0.106mol/L）

90g NaCl（1.5mol/L）

5ml Tween 20（0.5% *V/V*）

加水至 900ml

以 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调 pH 至 7.4

补加水至 1L

使用前稀释 10 倍

洗脱缓冲液（单元 10.5）

1ml Trition X-100

0.065g NaN_3

√152mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.5，1L

4℃可保存 30d

洗脱缓冲液（单元 12.2）

1%（*m/V*）SDS

√100mmol/L Tris·Cl，pH7.4

室温可保存 1 周

使用前加入 10mmol/L DTT（取粉末新鲜配制）

洗脱缓冲液（单元 13.2）

配制酸性洗脱液（从下列方法中选择一种）：

0.1mol/L 乙酸：用水溶解 570μl 冰乙酸，溶液终体积 100ml，室温下保存 1 周，

或4℃保存1个月。

甘氨酸/NaCl缓冲液：将750mg甘氨酸（终浓度0.1mol/L）和870mg NaCl（0.15mol/L终浓度）溶解到90ml水中。用HCl调pH至2.8。补加水至100ml，室温下保存1周，或4℃保存1个月。

0.1mol/L柠檬酸钠：将2.6g柠檬酸钠溶解到90ml水中。如果使用一水合盐，则只需要2.14g柠檬酸钠。用HCl调pH至3.0。补加水至100ml，室温下保存1周，或4℃保存1个月。

配制碱性洗脱液：

0.1mol/L乙醇胺：用80ml水溶解1g乙醇胺，浓HCl调pH至9.8。补加水至100ml，封口，室温下保存1d，或4℃保存1周。

配制中性洗脱液（从下列方法中选择一种）：

5mol/L盐酸胍：称取47.8g盐酸胍，放入烧杯中，加入大约60ml水，搅拌至完全溶解。加入10ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.5（见配方）。补加水至100ml，室温下保存1周，或4℃保存1个月。

4mol/L异硫氰酸钠：称取32.4g异硫氰酸钠，放入烧杯中，加入大约60ml水，搅拌至完全溶解。加入10ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.5（见配方）。补加水至100ml，室温下保存1周，或4℃保存1个月。

6mol/L尿素：称取36g尿素，放入烧杯中，加入大约60ml水，搅拌至完全溶解。加入10ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.5（见配方）。补加水至100ml，室温下保存1周，或4℃保存1个月。

洗脱缓冲液（单元15.1）

用275μl二甲基亚砜（DMSO）溶解24mg 3-硝基-4-羟基-苯乙酰氨基己酸（NP-CAP-OH；Biosearch Technologies）。取225μl溶液加入14.8ml PBS（见配方）中，使用前新鲜配制。

EMA溶液（单元6.2，6.3）

用PBS配制5μg/ml溴乙啡啶单偶氮。分装为100μl一份，−20℃暗处保存。临用前迅速解冻，置于冰上，注意避光。

EMEM-2.5培养基和EMEM-10培养基（单元9.7）

含Earle平衡盐的MEM培养基（Quality Biological），含有：

2.5%或10%（V/V）FBS

2mmol/L谷氨酰胺

50μg/ml庆大霉素

这两种培养基用于培养适于在EMEM生长的细胞（如BS-C-1细胞）。其他培养基也都有各自适用的细胞（如DMEM用于培养HeLa细胞，RPMI1640用于培养悬浮T细胞）。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

EMEM培养基，见含添加物的EMEM培养基

酶消化液（单元8.17）

每次用同一个小肠标本鉴定、分析、比较不同批次的3型胶原酶的活性。至少采用

3 个不同小肠标本重复检测，以保证筛选出最有效的胶原酶。选择最有效的产品，大量购买该批次胶原酶（3～5g）。

称量 10mg 选定的 3 型胶原酶（Worthington）和 10mg I 型脱氧核糖核酸酶，一起放入灭菌的 Erlenmeyer 瓶中，加入大约 50ml 无菌 HBSS，温和搅拌。加入 2.5ml 1mol/L HBSS，2.5ml 100×抗生素和抗真菌溶液（Life Technologies），搅拌子搅拌。补加 HBSS 至 100ml，密闭，混匀，避免泡沫，临用前新鲜配制。

盐酸乙醇胺，1mol/L，pH8.0（单元 13.2）

用 40ml 水溶解 3ml 乙醇胺，以浓 HCl 调 pH 至 8.0，补加水至 50ml，封口，室温保存。

溴化乙锭储存液，0.5mg/ml（单元 14.5）

50mg 溴化乙锭
100ml 水
避光保存

外源底物（单元 3.3）

大鼠肌肉烯醇酶：用 TPK 缓冲液（见配方）配制 1mg/ml 的大鼠肌肉烯醇酶（Sigma；作为硫酸铵沉淀剂）。0～4℃透析 8～12h，除去硫酸铵。

α-酪蛋白：酪蛋白溶解于 10mmol/L Tris · Cl，pH7.0，煮沸 10min，冷却至室温，0.45μm 滤膜过滤。

扩增培养基（单元 6.10）

RPMI 1640 中加入：
10% 人 AB^- 血清
10mmol/L HEPES
庆大霉素

FBS 可以替换人血清；不同批次的人和牛血清均应进行预先筛选，检测其刺激静息 NKT 细胞的效能。

FACS 缓冲液（单元 2.6）

1×HBSS，无 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}，不含酚红（Invitrogen）
0.1%（m/V）BSA
0.1%（m/V）NaN_3
4℃可保存 6 个月

FACS 缓冲液（单元 15.1）

√PBS
2%（V/V）FBS
0.1%（m/V）NaN_3
4℃可保存 1 年

Ficoll-Hypaque 溶液（单元 8.1、8.2、8.16、8.17 和单元 9.1）

用 600ml 水溶解 64.0g Ficoll（相对分子质量 400 000；终密度 1.077g/L；Sigma 等）和 0.7g NaCl，搅拌器低速搅拌。加入 99.0g 叠氮钠（Sigma）。溶解完全后，补加水至 1L。0.22μm 滤膜过滤。4℃或－25℃保存，避光。

另外，也可以购买商品化的 Ficoll-Hypaque 溶液（Ficoll-Paque；Pharmacia Biotech）。

cDNA 第一链缓冲液（单元 1.8）

√50mmol/L Tris·Cl，pH8.3

50mmol/L KCl

10mmol/L $MgCl_2$

1mmol/L DTT

分装为 50μl 一份，－20℃保存

FITC 标记缓冲液（单元 4.1）

0.05mol/L 硼酸

0.2mol/L NaCl

以浓 NaOH 调 pH 至 9.2

室温保存一周

固定液（单元 4.1）

2g 多聚甲醛（EM 级，Polysciences）

√100ml PBS

在通风橱中，低于 70℃热灭活 1h，以溶解试剂

冷却至室温

0.1mol/L HCl 或 0.1mol/L NaOH 调 pH 至 7.2

避光，4℃保存 1 个月，注意检测 pH。

如用于胞内抗原检测，因其对酸化非常敏感，只能采用新鲜配制的溶液。

固定剂（单元 11.2）

10%（V/V）37%甲醛

70%（V/V）甲醇

5%（V/V）冰醋酸

15%水

定影液（单元 9.7）

√PBS，pH7.4

20%（V/V）甲醛

2%（m/V）戊二醛

4℃可保存数周

固定液（单元 2.6）

将 1.25g 多聚甲醛（Sigma）加入 25ml 水中，搅拌，56℃，20min，如还有溶质没有完全溶解，滴加 1～5 滴 0.5mol/L NaOH。如此时溶液仍然不澄清，则重新配制溶液，并试用其他批次的多聚甲醛。加入 65ml 双蒸水，搅拌。加入 10ml 10×PBS（见配方），以 1mol/L HCl 调 pH 至 7.2，Whatman 滤纸过滤，4℃保存 2 个月。

固定液，考马斯亮蓝染色和银染用（单元 12.4）

50%（V/V）甲醇

10%（V/V）乙酸

40%水

室温可保存 1 个月左右

磷蛋白质凝胶固定液（单元 12.4）

配制小量胶：

50%（*V/V*）甲醇

10%（*V/V*）乙酸

配制 2-D 胶：

50%（*V/V*）甲醇

10%（*m/V*）三氯乙酸

室温可保存 1 个月

固定液，SYPRO Ruby 染色用（单元 12.4）

可选用以下的一种溶液固定（均用水配制）：

10%（*V/V*）甲醇

7%（*V/V*）乙酸/ 25%（*V/V*）乙醇

12.5%（*m/V*）三氯乙酸/ 10%（*V/V*）乙醇

7%（*V/V*）乙酸/ 50%（*V/V*）乙醇

3%（*V/V*）乙酸/ 40%（*V/V*）乙醇

10%（*V/V*）乙酸

室温可保存 1 个月

使用时这些固定液的体积应在胶体积的 5～10 倍以上。固定时，薄层胶（<0.75mm）较厚层胶可以迅速达到平衡。胶的体积越大，需要更大体积的固定液以交换其中的电泳缓冲液。

折叠缓冲液（单元 15.2）

100mmol/L Tris 碱

0.4mol/L L-精氨酸

√2mmol/L EDTA，pH8.0

以浓 HCl 调 pH 至 8.0

4℃可保存 1 个月

甲醛，2%（单元 6.2 和 6.3）

用 PBS 将 10%超纯的甲醛（Poly-sciences）稀释到 2%，不要采用福尔马林溶液。4℃可保存 1 个月，避光。

甲醛，4%（单元 14.10）

配制 100ml：

10.8ml 37%（*V/V*）甲醛

√89.2ml PBS

临用前配制

冷冻保存液，2×（单元 11.1）

√20ml FBS，热灭活

15ml 二甲基亚砜（DMSO）

65ml RPMI1640

4℃可保存2周

冷冻保存液（附录3B）

45ml FBS，56℃热灭活1h

5ml二甲基亚砜（DMSO）

混匀，0.45μm滤膜过滤

4℃可保存3个月

凝胶上样缓冲液（单元14.8）

95%（*V/V*）甲醛

√20mmol/L EDTA

0.05%（*m/V*）二甲苯蓝FF

0.05%（*m/V*）溴酚蓝

分装，4℃或室温下最多可保存1年

凝胶加样缓冲液，6×（单元14.7）

0.25%（*m/V*）溴酚蓝

0.25%（*m/V*）二甲苯蓝FF

30%（*V/V*）甘油

√5mmol/L EDTA

混匀分装，室温或−20℃保存。

凝胶感光底物（单元8.11）

琼脂糖/蒸馏水：每毫升水中溶解12mg琼脂糖。46℃融化，并维持在此温度。

琼脂糖/PBS：微波炉中完全融化琼脂糖，加入PBS至1%（*V/V*）终浓度。水浴冷却至46℃，并维持在此温度。

辣根过氧化物酶（HRP）：2ml甲醇中溶解50mg联苯二胺（PPD；Sigma，终浓度5mmol/L）（终浓度2%）。临用前，加入50μl 30%（*V/V*）H_2O_2（终浓度0.000 15%）和100ml琼脂糖/PBS（46℃），混匀后即可使用，PPD和HRP的反应会导致棕色或黑色斑点出现。

碱性磷酸酶（AP）：将预先配制的5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸对甲苯胺盐（BCIP）感光底物（Sigma）和等体积的琼脂糖/双蒸水混匀。BCIP与AP的反应会导致蓝色斑点出现。

该底物也可以用NBT来配制可溶性的感光底物（见配方），但融化琼脂糖必须按本项操作规范进行。

Gey溶液，1×（单元2.6）

√20ml Gey储存液A

√5ml Gey储存液B

√5ml Gey储存液B

70ml无菌水

4℃可保存数周

Gey 储存液 A（单元 2.6）

17.5g NH_4Cl

0.925g KCl

0.75g $Na_2PO_4 \cdot 12H_2O$

0.06g KH_2PO_4

2.5g 葡萄糖

调整体积至 500ml，高压灭菌

4℃可保存 3 个月

Gey 储存液 B（单元 2.6）

0.42g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

0.14g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0.34g $CaCl_2$

调整体积至 500ml，高压灭菌

4℃可保存 6 个月

Gey 储存液 C（单元 2.6）

以 100ml 水溶解 2.25g $NaHCO_3$，高压灭菌

4℃可保存 6 个月

戊二醛溶液，0.15%（单元 13.1）

将 30μl 25%戊二醛加入 5ml 50mmol/L 硼酸钠缓冲液中，pH8.0（以 HCl 调 pH）硼酸钠缓冲液中。新鲜配制。立刻使用。

注意：戊二醛是一种敏感剂，必须在通风橱中，严格按照 MSDS 推荐方法操作。盖紧，避免蒸气漏出。

假如戊二醛溶液出现沉淀，检查其 pH。溶液 pH 一般不高于 8.0，pH 稍低的溶液（pH7～8）也可以使用。

甘氨酸缓冲液（单元 12.1）

50mmol/L 甘氨酸/盐酸，pH2.5

√0.1%（V/V）Triton X-100

0.15mol/L NaCl

Greiss 试剂溶液（单元 6.5）

在 2.5%的磷酸（H_3PO_4）中依次溶解 1%（*m/V*）磺胺和 0.1%（*m/V*）二盐酸化萘二胺。置于玻璃瓶中，4℃保存；如果溶液出现变色、不澄清，则丢弃溶液。若变色或混浊，丢弃溶液。

盐酸胍，6mol/L（单元 13.1）

将 1g 盐酸胍溶解于 1ml 0.05mol/L、pH7.0 的磷酸钠缓冲液中。室温下可保存数月。所得溶液（1.8ml）约含 0.025mol/L 磷酸盐和 6mol/L 盐酸胍，pH7.0。

胍盐溶液（单元 1.85、14.5 和 14.7）

4mol/L 异硫氰酸盐酸胍

20mmol/L 乙酸钠，pH5.2

0.1mmol/L DTT

0.5% N-十二烷酰肌氨酸（Sarkosyl）

用水溶解异硫氰酸盐酸胍和相应数量的乙酸钠。可65℃温热，以溶解盐酸胍。加入DTT和N-十二烷酰肌氨酸，检测pH（应该在5.5左右）。如pH不符，用乙酸调pH。Nalgene滤器过滤，室温保存。

HBSS溶液（Hanks平衡液）

0.40g KCl（终浓度5.4mmol/L）

0.09g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度0.3mmol/L）

0.06g KH_2PO_4（终浓度0.4mmol/L）

0.35g Na H_2PO_4（终浓度4.2mmol/L）

0.14g $CaCl_2$（终浓度1.3mmol/L）

0.10g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$（终浓度0.5mmol/L）

0.10g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度0.3mmol/L）

8.0g NaCl（终浓度137mmol/L）

1.0g D-葡萄糖（终浓度5.6mmol/L）

0.2g 酚红（0.02%，选用）

加水至1L，以1mol/L HCl或1mol/L NaOH调pH至7.4

过滤，4℃保存1个月

盖紧，避免CO_2溢出和随之而来的溶液碱性化

HBSS可以从Biofluids或Bio-Whittaker公司购买。

可以配制或购买无Ca^{2+}和Mg^{2+}，不含酚红的HBSS溶液（CMF-HBSS）。Ca^{2+}和Mg^{2+}，酚红等成分都是选用的试剂，对实验结果没有什么影响。但实际上，在某些情况下，这些成分可能会干扰实验。是否添加这些成分需要依据实验方案推荐的方法选择。

HBSS/BSA（单元10.8）

将1%BSA（Sigma，FractionV）按1∶10加入含Ca^{2+}和Mg^{2+}的HBSS（见配方）中，0.2μm滤膜（Corning）过滤除菌，4℃可保存2个月。

HBSS/EDTA（单元10.10）

√HBSS，无Ca^{2+}和Mg^{2+}，含有：

10% FBS

15mmol/L HEPES

√5mmol/L EDTA

0.014%（m/V）DTT

4℃可保存4周

HBSS /10%（V/V）FBS和HBSS/3%（V/V）FBS（单元2.4）

56℃ 45min热灭活FBS，过滤。取HBSS（购买商品试剂或按配方配制），加入不同量的FBS，分别配制含10%和3%（V/V）FBS的HBSS溶液。在10%FBS的HBSS溶液中加入酚红，而3%FBS的溶液不加酚红，以示区分。4℃可保存6个月。

含添加物的HBSS（单元10.6）

√HBSS，含有：

9mmol/L HEPES

100U/ml 青霉素

100μg/ml 链霉素

调 pH 至 6.9

4℃可保存 2 个月

HBSS 洗涤缓冲液（单元 2.2）

√HBSS，含有：

5%（V/V）FBS

20mmol/L HEPES，pH7.0

100U/ml 青霉素（可选）

100μg/ml 链霉素（可选）

4℃可保存 1 个月

HeBS（HEPES 缓冲盐），2×（单元 14.1）

配制无水合的 75mmol/L Na_2HPO_4（5.32g 加入 500ml 水中）储存液。配制 10ml 储存液，需要 8.0g NaCl 和 6.5g HEPES 酸。加水至 500ml。0.2μm 滤膜（Nalgene）过滤。以 1mol/L HCl 调 pH 至 6.99。分装，4℃可保存 6 个月到 2 年。

匀浆缓冲液（单元 10.5）

5.8g NaCl

0.65g NaN_3

2.922g EDTA

3.804g EGTA

1.849g 碘乙酰胺

0.179g PMSF

√100ml 10mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH7.5，

用 NaOH 调 pH 至 7.5

补加水至 1L

4℃可保存 30d

杂交缓冲液 I（单元 14.10）

√400μl 1mol/L Tris · Cl，pH7.5

2ml 10%（m/V）BSA 溶液

80μl 5mol/L NaCl

2.3ml H_2O

15ml 甲醛（Fluka）

√20μl 30μg/ml PNA FITC 末端探针

新鲜配制，避光保存

用前混匀

杂交缓冲液 II（单元 14.10）

√10μl 1mol/L Tris · Cl，pH7.5

700μl 甲醛（Fluka）

√100 封闭缓冲液

√30μl 10μg/ml PNA Cy3 末端探针

160μl H_2O

使用前新鲜配制

杂交溶液（单元 9.5）

1×SCC

√1×Denhardt 溶液

√1×（*m*/*V*）SDS

－20℃可保存 6 个月

杂交溶液（单元 14.6）

√5×SSPE

√5×Denhardt 溶液

100mg/ml 鲑鱼精子 DNA

0.1%（*m*/*V*）SDS

新鲜配制

杂交溶液（单元 14.7）

50%（*m*/*V*）甲醛

√5×SSC

√2.5×Denhardt 溶液

1%（*m*/*V*）SDS

200μg/ml 青鱼精子 DNA，煮沸

新鲜配制

IF12，见 IF-12 完全培养基

补充 IL-2 的培养基（单元 9.6）

配制完全 RPMI-15 培养基（见配方）。

培养 ATH8 细胞：培养基中还需添加 10%（*V*/*V*）去凝集素的 IL-2（Advanced Biotechnologies）和 20U/ml 重组 IL-2（Amgen）。培养 IL-2 非依赖的 T 细胞如 MT2 细胞，可以不添加 IL-2。培养正常 T 细胞和 PHA 激活的 PBMC，添加 5～20U/ml IL -2（分别检测，确定培养各型细胞的最佳 IL-2 含量）。

此培养基的概要、成分和配制方法请见本附录开始部分。

IMDM，见 IMDM 完全培养基。

包含体洗涤缓冲液（单元 15.2）

√50mmol/L Tris · Cl，pH8.0

依据实验要求加入或不加入 0.5%（*V*/*V*）Triton X-100

100mmol/L NaCl

√1mmol/L EDTA，pH8.0

0.1%（*m*/*V*）咪唑

使用前加入 1mmol/L DTT

指示剂（单元 8.12）

400mg NaOH（终浓度 0.01mol/L）

取 10ml 1mg/ml 酚酞加入甲醇中（终浓度 0.001%）
补加水至 1L
以浓 HCl 调 pH 至 4.2
室温可保存 1 个月

注射缓冲液（单元 15.2）

3mmol/L 盐酸胍
10mmol/L 乙酸钠
10mmol/L EDTA
以浓 HCl 调 pH 至 4.2
室温可保存 1 个月

Iscove/RPMI，见含添加物的 Iscove/RPMI

KB（激酶缓冲液）（单元 3.5）

2×储存液：
50mmol/L HEPES pH7.4
50mmol/L β 磷酸甘油钠
50mmol/L $MgCl_2$
4℃保存 1 年
1×缓冲液：
使用前稀释至 1×，并加入：
0.1mmol/L 原钒酸钠（Sigma；取自 100mmol/L 储存液，分装，−20℃保存）
0.5mmol/L DTT（DTT；取自 2mol/L 储存液，分装，−20℃保存）

Kerbs-Henseleit 溶液（单元 10.9）

118mmol/L NaCl
25mmol/L $NaHCO_3$
2.8mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
1.17mmol/L $MgSO_4$
4.7mmol/L KCl
1.2mmol/L KH_2PO_4
2g/L 葡萄糖
过滤除菌
当天配制，4℃保存

LB 培养基（单元 14.2、15.1 和 15.2）

10g 蛋白胨
5g 酵母粉
5g NaCl
1ml 1mol/L NaOH
补加水至 1L
混匀，高压灭菌 25min，冷却至≤50℃，加入选择性抗生素和其他补充营养成分。
LB 原始配方中不含 NaOH。LB 的多种不同配方的差异就在于添加 NaOH 的量。

虽然LB培养基已经用NaOH调节pH至7.0左右，但本培养基的缓冲能力一般，培养过程中，溶液缓冲能力接近饱和时，溶液pH会下降。

LB培养平皿（单元14.2、14.6～14.9和15.1）

10g蛋白胨

5g酵母粉

5g NaCl

1ml 1mol/L NaOH

15g琼脂

补加水至1L混匀，高压灭菌25min，冷却至≤50℃。加入选择抗生素，缓缓注入平皿（每100ml平皿注入32～40ml），合上平皿盖，待基质凝固。37℃孵箱烘干。4℃保存。如果添加了四环素，使用锡箔包裹平板或置于暗处保存。

含IPTG/Xgal（单元14.7）平皿：临用前，加入200μl 100mg/ml IPTG和40μl 25mg/ml Xgal到100mm平皿中，均匀铺开。室温放置，如平皿潮湿，可以烘干。

含Xgal（单元14.8）平皿：添加100μg/ml氨苄时同时加入20μg/ml Xgal（可在培养基冷却后、铺板前添加）。

脂类显影试剂（单元3.6）

8%（*V*/*V*）磷酸

3%（*m*/*V*）乙酸铜

室温可保存1个月以上

NiCl沉淀液（单元9.5）

7.5mol/L NiCl

√50mmol/L EDTA

混匀，4℃保存。

大鼠补体，低Tox-M，无菌复溶（单元2.4）

将冻干的低Tox-M大鼠补体（Accurate Chemical，Scientific）用无菌的HPLC级的纯水溶解，临用前配制。如需要，可以用0.45μm滤膜过滤除菌。滴定法测定每批次产品的细胞毒活性。记住始终置于冰上操作。冻存时需迅速置入－70℃冰箱中，于－70℃可保存6个月。

氨基苯二酰肼显色液（单元12.5）

0.5ml 4mg/ml溶解于DMSO中的氨基苯二酰肼（Sigma）

0.5ml 1mg/ml溶解于DMSO中的异丙醇（Aldrich）

√2.5ml 100mmol/L Tris·Cl，pH7.5

25μl 3% H_2O_2

H_2O 5ml

使用前配制

配方来源于Schneppenheim等（1991）。可以预先混匀氨基苯二酰肼底物混合剂（Mast Immunosystems；Amersham ECL；DuPont NEN Renaissance；Kirkegaard& Perry LumiGLO）。选用异丙醇可提高发光强度。氨基苯二酰肼和异丙醇在－20℃下可保存6个月。

赖氨酸洗液（单元 7.2）

溶解 36.54g 赖氨酸于水中，0.22μm 滤膜过滤，4℃下储存。使用前，以等体积的 DMEM（无血清）稀释。

裂解液，10×，1×（单元 5.10）

10×储存液：

41.4g NH_4Cl（1.55mol/L）

5g $KHCO_3$（100mmol/L）

√1ml 0.5mol/L EDTA（1mmol/L）

加入 500ml 双蒸水

以 1mol/L HCl 调 pH 至 7.3

4℃保存

1×溶液：用水按 1∶10 稀释 10×储存液，新鲜下配制，室温下使用。

裂解缓冲液（单元 2.6）

0.5%（*V/V*）NP-40 底物。1%（*V/V*）Triton X-100，或 1%（*V/V*）Brij-96（Sigma）

√20mmol/L Tris · Cl，pH7.6

150mmol/L NaCl

10nmol/L NaF

1mmol/L Na_3VO_4

√1mmol/L EDTA

4℃可保存 3 个月

使用前加入：

1mmol/L PMSF（Sigma）

2μg/ml 抑肽酶（Sigma）

2μg/ml 亮抑酶肽（Sigma）

以上 3 种物质都可以配成 100×储存液，－20℃保存。

裂解缓冲液，2×（单元 3.2）

√1ml 1mol/L Tris · Cl，pH8.0（0.04mmol/L）

2.3ml 3mol/L NaCl（0.276mol/L）

10ml 50%（*V/V*）甘油

5ml 10%（*V/V*）NP-40

25μl 50mmol/L 以 DMF 配制的 *p*-胍基苯硝酸盐（Sigma，玻璃瓶，4℃避光保存）

50μl 10mg/ml 抑肽酶（Boehringer Mannheim）

50μl 10mg/ml 亮抑酶肽（Boehringer Mannheim）

0.5ml 0.1mol/L 原钒酸钠（Sigma）

√0.2ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0

1ml 0.5mol/L NaF

加水至 25ml

使用前配制

裂解缓冲液（单元 12.1）

√TSA 溶液包含：

√2%（*V/V*）Triton X-100（配方见变性储存缓冲液）

5mmol/L 碘代乙酰胺

抑肽酶（胰岛素抑制剂 0.2U/ml）

1mmol/L PMSF（用完全乙醇配制的 100mmol/L 储存液稀释）

如实验需要激活半胱酸酶时可不添加去碘代乙酰胺。

NP-40 可代替 Triton X-100 使用。

裂解缓冲液（单元 14.10）

√10mmol/L Tris · Cl，pH7.5

1mmol/L $MgCl_2$

1mmol/L EGTA

5μmol/L 2-ME

0.5%（*m/V*）CHAPS

10%（*V/V*）甘油

√0.1mmol/L PMSF（使用前加入）

裂解缓冲液，带蛋白酶抑制剂，5×，1×（单元 3.3）

1×缓冲液：

√10ml NP-40 缓冲液

1mmol/L 原钒酸钠（取自 1mol/L 储存液，Fisher）

10μg/ml 抑肽酶（取自 1mol/L 储存液，Sigma）

10μg/ml 亮抑酶肽（取自 1mol/L 储存液，Sigma）

5mmol/L NaF（取自 0.5mol/L 储存液，Sigma）

1mmol/L PMSF（用完全乙醇配制的 100mmol/L 储存液中稀释）。

5×缓冲液：配制 5×浓度的 NP-40 缓冲液（见配方），4℃保存，使用前加入 5 倍量的其他试剂。

M9 培养基（单元 14.3）

配制 5× M9 盐：

64g $Na_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 或 85.5g $Na_2PO_4 \cdot 12H_2O$

15g KH_2PO_4

2.5g NaCl

5g NH_4Cl

1L 水

高压灭菌

室温保存

液体培养基：800ml 水中加入 200ml 灭菌的 5×M9，2ml 1mol/L $MgSO_4$，20ml 20%（*m/V*）葡萄糖，0.1ml 1mol/L $CaCl_2$，维生素 B1（终浓度 10μg/ml）。

琼脂板：800ml 水中加入 18g 琼脂，高压灭菌。冷却至 45℃，加入 200ml 灭菌的 5×M9，2ml 1mol/L $MgSO_4$，20ml 20%（*m/V*）葡萄糖，0.1ml 1mol/L $CaCl_2$，维生

素 B1（终浓度 10μg/ml），立刻注入平板中（20ml/板），4℃保存 30d。

MACS 缓冲液（单元 2.2）

√PBS，pH7.2

0.5%（*m*/*V*）BSA

√2mmol/L EDTA

过滤除菌

用于自动 MACS 系统，室温储存 1 个月。

用于 LS 或 LD 柱时，脱气，4℃保存。

MBB（改良的巴比妥缓冲液），5×（单元 2.5）

2.88g 巴比妥 C-IV（巴比妥酸衍生物，Fisher Sciences）

1.88g 巴比妥钠 C-IV（巴比妥酸衍生物，Fisher Sciences）

0.11g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

0.51g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

42.5g NaCl

溶解巴比妥 C-IV 于 400ml 热水中（50～60℃），然后加入其他成分。冷却，调整体积至 1L。室温可保存 6 个月。pH 约为 7.0。

2-ME（2-巯基乙醇），50mmol/L

配制 1mol/L 储存液：

0.5ml 14.3mol/L 2-ME

6.6ml H_2O

配制 50mmol/L 储存液：

5ml 1mol/L 2-ME

95ml H_2O

4℃保存 4 个月。

用于配制培养基时，需使用前加入，终浓度约 50μmol/L。

甲醇/乙酸脱色液（单元 12.4）

5%（*V*/*V*）甲醇

7%（*V*/*V*）乙酸

88% 水

室温可保存 1 个月左右

甲泛葡胺，14.5%（单元 8.18）

将 25g 甲泛葡胺（Sigma，99%纯度，1 级）溶解于灭菌的 250ml 有梯度的圆柱状容器内，用 150ml RPMI1640 完全培养基重悬甲泛葡胺瓶的底部（见配方），倒入容器。溶解，溶液体积约 172ml，无菌容器过滤，4℃避光保存。用前取出室温放置。

甲泛葡胺密度对细胞分离非常重要。在使用每批次新鲜配制的甲泛葡胺溶液前，必须测定、评估其分离细胞的最佳密度。

PCR 扩增缓冲液，无 $MgCl_2$，10×（单元 14.5、14.6 和 14.8）

500mmol/L KCl

√100mmol/L Tris·Cl，pH9.0（25℃）

0.1% Triton X-100

−20℃保存

该溶液可从 Promega 购买，其中添加了 *Taq* DNA 聚合酶。

Mishell-Dutton BSS（平衡盐溶液）（单元 10.1）

储存液 1：

10g 葡萄糖

0.6g KH_2PO_4

3.58g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

20ml 0.5%酚红

补水至 1L，0.22μm 过滤除菌。

储存液 2：

1.86g $GaCl_2 \cdot 2H_2O$

4.0g KCl

80.0g NaCl

1.04g $MgCl_2 \cdot H_2O$

2.0g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

补水至 1L，0.22μm 过滤除菌。

工作液（1×BSS）：将 100ml 储存液 1 加入到 700ml 水中，再加入 100ml 储存液 2（两种储存液不要直接混合），补水至 1L，加 100μl 2mol/L NaOH ，调 pH 至 7.4。

改良的巴比妥缓冲液，见 MBB

改良的 Bouin 固定液（单元 10.6）

85ml 饱和水杨酸

5ml 冰乙酸

10ml 38%～40%甲醛

新鲜配制

改良的 PBS（单元 2.5）

8.0g NaCl

0.2g KCl

0.2g KH_2PO_4

1.15g Na_2HPO_4

补加水至 500ml

4℃可保存 6 个月

改良的 RIPA 缓冲液（单元 3.3）

20mmol/L MOPS，pH7.0

150mmol/L NaCl

√1mmol/L EDTA

1%（*V*/*V*）NP-40（Fluka）

1%（*m*/*V*）去氧胆酸钠（Sigma）

0.1%（*m*/*V*）SDS（Bio-Rad）

单克隆抗体无菌储存液（单元 2.4）

购买 MAb 商品化试剂，或用杂交法制备单抗，经 FACS 染色测定每批次产品的饱和浓度（见第四章）。用 PBS 稀释单抗，使其浓度降到饱和浓度（1mg/ml MAR18.5）的 1/10 以下。（最终工作浓度往往<20μg/ml）过滤，4℃可保存 3 个月。

MUP 底物溶液（单元 1.1）

0.2mmol/L 磷酸 4-甲基伞形酯（MUP，Sigma）

0.05mol/L Na_2CO_3

0.5mmol/L $MgCl_2$

室温保存

NaCl/Triton 缓冲液（单元 10.5）

29.2g NaCl

5ml Triton X-100

√加 PBS 到 1L

4℃可保存 30d

NDET 溶液（单元 1.8）

1%（*V*/*V*）NP-40

0.4%（*m*/*V*）去氧胆酸钠

66ml EDTA

√10mmol/L Tris·Cl，pH7.4

4℃保存

中性脂类标准品（单元 3.6）

胆固醇

胆固醇酯（可选）

三酰甘油（可选）

卵磷脂（生物来源，非合成）

磷脂酰乙醇胺（生物来源，非合成）

（神经）鞘磷脂（生物来源，非合成）

转葡糖基神经酰胺（半乳糖神经酰胺，或脑神经酰胺）

视实验要求适当补充中性鞘糖脂

用 1∶1（*V*/*V*）氯仿/甲醇溶液溶解 4 种脂类，溶液中每种脂类的浓度分别为 1、3、5、7μg/ 5μl。－20℃可储存数月，特氟纶瓶保藏。

营养脂类可从 Avanti Polar Liqid 购买，也可从 Calbiochem 或 Sigma 购买。

常用的中性鞘糖脂可从 Calbiochem 购买。

胆固醇酯和三酰甘油不是 DRM 的必需成分，但可以在配制标准品时选用。DRM 上出现脂类，可能是来源于 5%蔗糖层顶部的悬浮的脂肪块。培育 DRM 时必须去除这些脂类。

中和液（单元 14.10）

√1.5mol/L Tris·Cl，pH7.2

1.5mol/L NaCl

室温可保存1年

NNN培养基（单元11.1）

将25.0g Bacto Beef（Difco）与500ml双蒸水混合，56℃水浴1h。高压灭菌5min，然后迅速降温（这对分解Bacto Beef非常重要）。过滤后加入10.0g新蛋白胨，10.0g Bacto Beef（Difco）和2.5g NaCl，以3mol/L NaOH调pH至7.2～7.4，高压灭菌20min。分装70ml一份到100ml的无菌玻璃瓶中。冷却后，4℃可保存1年。

非变性裂解缓冲液（单元12.2）

1%（*m/V*）Triton X-100（室温下避光保存）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.4

300mmol/L NaCl

√5mmol/L EDTA

0.02%（*m/V*）叠氮钠

4℃保存6个月

使用前加入：

10mmol/L碘乙酰胺（粉末）

1mmol/L PMSF（将PMSF溶解在100%的乙醇中配制成100mmol/L的储存液，－20℃保存6个月）

2μg/ml亮抑酶肽（将亮抑酶肽溶解在水中配制成10mg/ml的储存液，－20℃保存6个月）

1mmol/L 4-(2-氨基）甲苯苯磺酰氟（AEBSF）可替代PMSF，预先将AEBSF溶解在水中配制成0.1mol/L的储存液，该储存液可在－20℃保存1年。

正常血清（单元6.6）

从补体C3富足的适宜个体内取血（例如，从小鼠心脏穿刺取血，以获得小鼠单核/巨噬细胞）。立即置于冰上，凝集1h以上。4℃，600*g*离心25min。收集血清，0.5ml一份冻存于－80℃。检验每批次血清，验证其吞噬、杀伤能力。血清一旦融化，不能反复冻融使用。

小鼠血清可以从那些不适于繁殖、相对老而大的个体取得，不建议购买商品化产品。

NP-40缓冲液（单元3.3）

√50mmol/L Tris·Cl，pH8.0

150mmol/L NaCl

√2mmol/L EDTA

1%（*V/V*）NP-40（Fluka）

4℃保存

NPP底物液（单元1.1）

3mmol/L p-磷酸硝基苯（NPP；Sigma）

0.05mol/L Na_2CO_3

0.5mmol/L $MgCl_2$

4℃保存

尼龙毛柱（单元 8.6 和 8.17）

将尼龙毛（200L 型，Robbins Scientific）置于 4L 的烧瓶中。用超过 1%（*V/V*）的盐酸浸泡。煮沸 5～10min，盖紧瓶口，温和振荡。冷却，倒出液体。挤压尼龙毛以排出液体，并用水洗。为除去 HCl 至少重复洗涤 10 遍。室温下晾干尼龙毛（保存）。

柔软的尼龙毛（参见下面剂量）需要使用带两个尖牙的毛刷梳理，以免打结、缠绕。如果使用几块尼龙毛，需要将它们依次梳理。从 20～30ml 一次性注射器上取下推杆，将尼龙毛插入针管。压紧尼龙毛。丢弃推杆，在针筒内塞入铝箔，盖紧。110℃高压 15min。缓缓降温。室温下可贮藏数月。

单元 8.6：30ml 体积的针管内装入 1.8g 尼龙毛，充填约 18ml 体积。一根尼龙毛柱可适于≤1×10^{9} PBMC。从一份 leukopak 中处理 PBMC 大概需要 4～5 根尼龙毛柱。

单元 8.17：在 20ml 的针管内填入 1.6～2.0g 尼龙毛。

寡核苷酸杂交液（单元 14.7）

50%（*V/V*）甲酰胺
√5×SSPE
0.5%（*m/V*）SDS
√1× Denhardt 试剂
100μg/ml 煮沸的青鱼卵 DNA
新鲜配制

寡核苷酸预杂交液（单元 14.7）

参考寡杂交液的配制（见配方），但需将 Denhardt 试剂的浓度提高至 5×。

多聚甲醛，4%（单元 5.8）

13.4g $Na_2HPO_4\cdot7H_2O$（终浓度 0.05mol/L）
6.9g $NaH_2PO_4\cdot7H_2O$（终浓度 0.05mol/L）
加入 900ml 水，用磁力搅拌器混匀

将上述溶液倒入一较大的 Erlenmeyer 烧瓶中，将烧瓶放在化学通风橱内中的平板上，搅拌。加入 40g PFA，注意不要将试剂粉尘外泄。加热至 60～70℃，搅拌 30～45min；可加入少量的 1mol/L NaOH 以促进 PFA 溶解。溶液冷却后，加水至 950ml，以 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0，然后用水定容至 1L。分装到 15ml 管中，－20℃可保存 1 年。

注意：PFA 是一种潜在的致癌剂，在通风橱中加热 PFA 时必须戴手套、穿防护服。

多聚甲醛溶液，2%，溶解在 PBS 中（单元 7.2）

在 56℃水浴中加热 500ml PBS（见配方），然后加入 10g 多聚甲醛。缓慢搅拌 1h，直至多聚甲醛溶解（可能仍有少量的多聚甲醛未溶解）。维持溶液温度在 56℃，不要沸腾。通过 0.22μm 滤膜将该溶液真空过滤至一无菌瓶中，4℃保存。

多聚甲醛溶液（单元 2.8）

将 1%（*m/V*）多聚甲醛和 0.01%（*V/V*）Tween 20 溶解在 PBS 中，加热，维持在 70℃，搅拌以溶解多聚甲醛。该溶液室温下可保存 6 个月，使用前用 0.2μm 滤膜过滤。

PBE（磷酸盐缓冲的 EDTA 溶液）（单元 13.2）

将 2.3g 三水合磷酸氢二钾（终浓度为 100mmol/L）和 190mg 二水合 EDTA·2Na（终浓度为 5mmol/L）溶解在 90ml 水中，如果使用无水合的磷酸氢二钠，则只需加入 1.8g。缓慢加入固体，防止结块，充分搅拌以溶解溶质，以 HCl 调节 pH 至 7.5，加水定容至 100ml，该溶液于室温可保存 1 周，在 4℃可保存 1 个月。

PBS（磷酸盐缓冲液）

0.23g NaH_2PO_4（无水；终浓度 1.9mmol/L）

1.15g Na_2HPO_4（无水；终浓度 8.1mmol/L）

9.00g NaCl（终浓度 154mmol/L）

加入 900ml 水，以 1mol/L NaOH 或 1mol/L HCl 调节 pH 至 7.2～7.4

加水定容至 1L

PBS（单元 3.5）

√20mmol/L 磷酸钠，pH7.4

150mmol/L NaCl

4℃可保存 1 年

PBS（单元 13.2）

将 5.7g 三水合磷酸氢二钾（终浓度为 25mmol/L）和 8.7g NaCl（终浓度为 150mmol/L）溶解在 950ml 水中，如果使用无水合磷酸氢二钠，则只需加入 4.4g。缓慢加入固体，防止结块，充分搅拌以溶解溶质，以 HCl 调节 pH 至 7.5，加水定容至 1L，封口后于 4℃可保存 1 周。

PBS（单元 13.3）

0.78g NaH_2PO_4（终浓度 7mmol/L）

3.8g Na_2HPO_4（终浓度 27mmol/L）

8.5g NaCl（终浓度 145mmol/L）

加入 900ml 水，以 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0，再加水定容至 1L

该溶液可在 4℃保存 1～2 个月

PBS（单元 14.3）

5.84g NaCl

4.72g Na_2HPO_4

2.64g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$，pH7.2

补加水至 1 L

室温保存

PBS/叠氮化物，pH7.4（单元 5.9）

160g NaCl

4g KCl

23g 无水 Na_2HPO_4

4g KH_2PO_4

26g NaN_3

加水定容至 20L

在 15L Milli-Q 水或等量的双蒸水中溶解溶质；补水至 20L，检测溶液的 pH 和渗透压。如需要，以 HCl 或 NaOH 调 pH 至 7.4。如渗透压过高，加水调整渗透压至 281～295mOsM。于室温可保存 1 个月；如实验需要冷的溶液时，请至少取出 1L，4℃保存。

PBS/BSA（单元 5.8）

√PBS

0.1%（*m/V*）BSA

0.05%（*m/V*）NaN_3

4℃可保存 6 个月

PBS/BSA（单元 10.8）

√9 份 PBS

1 份 0.1%（*m/V*）BSA（Sigma，组分 V）

用 0.2μm 滤膜（Corning）过滤除菌

4℃可保存 2 个月

PBS，含蛋白酶抑制剂（单元 15.2）

√PBS

1mmol/L EDTA

1μg/ml 抑肽素

1μg/ml 亮抑蛋白酶

200μmol/L PMSF

新鲜配制

PBS-S（单元 5.8）

√PBS

√0.1%（*m/V*）皂苷

1mmol/L $CaCl_2$

1mmol/L $MgSO_4$

0.1%（*m/V*）BSA

0.05%（*m/V*）NaN_3

10mmol/L HEPES

以 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.4

4℃保存 6 个月

PBS-S/牛奶（单元 5.8）

在 PBS-S 溶液（PBS-S）中加入 5%脱脂奶粉，磁力搅拌器搅拌 15min。室温，15 000*g*离心 30min 沉淀奶粉颗粒，取澄清的乳色上清液保存，在 4℃可保存 6 个月。

PBST（单元 13.2）

√1L PBS，pH7.5

1ml Tween 20（终浓度为 0.1%）

缓慢搅拌溶解

盖上瓶盖，于室温保存过夜，或 4℃下至多保存 1 周。

PCB（磷酸盐/柠檬酸缓冲液）（单元 14.3）

51.4ml 1mol/L Na_2HPO_4

48.6ml 0.5mol/L 柠檬酸

1L 水

高压灭菌

室温下最多保存 1 年

PCR 扩增缓冲液，10×（单元 1.8）

√100mmol/L Tris · Cl，pH8.0

15mmol/L $MgCl_2$

500mmol/L KCl

1mg/ml BSA

分装成 50μl 一份，－20℃保存

PCR 扩增缓冲液，10×（单元 14.7）

√200mmol/L Tris · Cl，pH8.5

15mmol/L $MgCl_2$

250mmol/L KCl

1%（V/V）Triton X-100

可在－80℃长期保存

PCR 扩增缓冲液，可参考无 $MgCl_2$ 的配方

PCR 缓冲液，10×（单元 9.5）

√200mmol/L Tris · Cl，pH8.4

500mmol/L KCl

－20℃可长期保存

PEG（聚乙二醇）溶液，50%（单元 1.3）

将 10g PEG 4000（Merck，ATCC）装在 Wheaton 玻璃瓶中，高压灭菌，冷却，在其凝固（约 55℃）前，加入 10ml 无血清 DMEM 完全培养基（见配方）。不要采用含蛋白质的培养基，因为 PEG 能够沉淀蛋白质。该溶液可在室温下保存数月（溶液将变成碱性，但不影响其使用），配制的溶液足以进行 20 次以上的融合实验。

PEG（聚乙二醇）溶液，50%（单元 2.13）

将 10g PEG 4000（Merck，ATCC）装在 Wheaton 玻璃瓶中，高压灭菌，冷却，在其凝固前，加入 10ml 无血清 DMEM 培养基（洗涤培养基）。不要采用含蛋白质的培养基，因为 PEG 能够沉淀蛋白质。每 2ml 溶液分装至一个 4ml 无菌聚丙烯管中，盖紧瓶盖，室温保存。

不同批次的 PEG 的融合结果不尽相同，因此需要对每批次的 PEG 进行筛选。效能好的批次在储存四周后，仍然能获得良好的融合效果；更长时间的储存效果尚无验证。

PEG/NaCl（单元 14.3）

200g PEG 6000

146.1g NaCl

1L 水

加热溶解

高压灭菌

室温可保存 1 年

沉淀物裂解缓冲液（单元 3.6）

√50mmol/L Tris · Cl，pH8.8

√5mmol/L EDTA

1%（*m/V*）SDS

室温最多可保存 1 年

胃蛋白酶溶液（单元 14.10）

10mg 胃蛋白酶（Sigma）

10ml 酸化水：1∶1（*V/V*）10mol/L HCl/H_2O

使用前新鲜配制

Percoll 液，70%（单元 2.11）

稀释液：

√45ml 10×PBS，pH7.4

3ml 0.6mol/L HCl

132ml 水

过滤除菌

70% Percoll 液：

63ml Percoll（Pharmacia LKB）

37ml 无菌稀释液

溶液最终渗透压为 310～320 osM

Percoll 液，30%（单元 8.17）

在 Percoll 溶液中加入 7.5%（*V/V*）10×无酚红的 HBSS（见配方）和 2.5%（*V/V*）1mol/L HEPES，用水调节溶液渗透压至 285mOs/kg，再用无酚红的 HBSS 稀释成 30%的 Percoll 溶液。临用前新鲜配制。

使用无酚红的 HBSS 可提高梯度分离细胞时的可见度。

Percoll 液，30%和 70%（单元 10.10）

将 450ml 完全 Percoll（Pharmacia）与 50ml 10×PBS（见配方）混合配制成 100%的储存液，补加 0.5mol/L EDTA（见配方）至终浓度为 1mmol/L。该溶液可在 4℃保存 6 个月。使用前用含有 1mmol/L EDTA 的 PBS 稀释至所需浓度。

透析液（单元 4.1）

200μl Tween 20（Sigma）

√100ml PBS

存放在褐色容器内，4℃保存不能超过 1 个月

使用前预热至室温

过氧化物酶底物溶液（单元 4.1）

137mg 2,2′-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)（ABTS；Boehringer Mannheim）

√250ml 底物缓冲液，pH4.2

储存液可在−20℃至多保存4个月

使用前，在2ml储存液中加入12μl 30%（*V*/*V*）H_2O_2

磷酸盐缓冲液，1mol/L（单元1.8）

59.4g NaH_2PO_4

81.0g Na_2HPO_4

加水定容至1L

室温保存

磷酸盐缓冲液/六氮化碱性副品红/α-丁酸萘（附录3D）

0.15mol/L磷酸盐缓冲液，pH6.3

A：9.47g/L Na_2HPO_4（0.15mol/L）

B：20.4g/L KH_2PO_4（0.15mol/L）

将1份体积的A液与3份体积的B液混合，用pH计测量pH（正确的pH应该是6.3），如果需要，用A液或B液调节pH。

六氮化碱性副品红

在2ml双蒸水中加入0.5ml浓盐酸和0.1g碱性副品红·HCl（Sigma），加热溶解，将0.4g亚硝酸钠溶解在10ml蒸馏水中配成4%亚硝酸钠溶液。在使用前将等体积的碱性副品红·HCl和4%亚硝酸钠溶液混合1～2min。

α-丁酸萘（稀释液）

将冻存在塑料管中的α-丁酸萘（Sigma）于室温下融化。使用前将40μl液化的α-丁酸萘加入到2ml乙二醇单甲基醚（Fisher）中。

完全染液

将38ml 0.15mol/L磷酸盐缓冲液，pH6.3，0.2ml六氮化的碱性副品红和2ml稀释的α-丁酸萘混合。使用前过滤混浊的白色染液，并用pH计测量pH（正确的pH应该是6.3），如果需要，用A液或B液调节pH。

为了区分间质细胞和巨噬细胞，在培养混合物中加入15mg氟化钠（15mg）。其他一些酯酶如利用氯乙酸酯酶可用于鉴定嗜中性粒细胞和少量的肥大细胞；此时，通常采用氯乙酸萘酚作为底物。

磷酸盐缓冲液，见PBS

磷酸盐凝胶，5%（单元1.8）

配制10ml凝胶：

1.67ml 30%（*m*/*V*）丙烯酰胺/0.8%（*m*/*V*）双丙烯酰胺

√1ml 1mol/L磷酸盐缓冲液

√0.1ml 10% SDS

8.33μl TEMED

7.23ml 水

混匀后，加入0.1ml 10%（*m*/*V*）过硫酸铵

磷酸盐凝胶电泳缓冲液（单元1.8）

√100ml 1mol/L磷酸盐缓冲液

√10ml 10% SDS

加水定容至1L

室温保存

磷蛋白凝胶脱色液（单元12.4）

配制1L脱色液，需将50ml 1mol/L乙酸钠，pH4.0加入到800ml蒸馏水中，再加入150ml 1,2-丙二醇（或40ml乙腈；见下述），加水定容至1L，混匀。另外，还可以从Molecular Probe公司购买商品化的脱色液产品。该溶液可在室温下保存1个月。

如果没有1，2-丙二醇，可用4%乙腈替代。必须注意：乙腈是一种有毒的化合物，使用它时必须严格遵守废液处理规范。

溶血空斑培养基（单元9.6）

DMEM培养基添加：

4%（*V/V*）FCS，56℃热灭活1h

100U/ml青霉素G

100μg/ml链霉素

2mmol/L谷氨酰胺

8μg/ml DEAE-葡聚糖

0.5μg/ml polybrene（1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物；Abbott Laboratories）

此培养基的概要、成分和配制方法见本附录开始部分。

2×HAT培养基（单元2.13）

将100×次黄嘌呤/氨基蝶呤/胸苷（Life Technologies）稀释后加入到2×DMEM-20完全培养基（见配方）中，该溶液可在4℃保存2个月。

1×HT培养基（单元2.13）

将100×次黄嘌呤/胸苷（Life Technologies）稀释后加入到1×DMEM-10完全培养基（见配方）中，该溶液可在4℃保存2个月。

PMSF溶液，100mmol/L（单元14.10）

17.4mg苯甲基磺酰氟

10ml异丙醇

该溶液可在室温下保存1年

预先配制100×储存液（通常要花费数小时才能溶解PMSF），为处理琼脂糖包埋的细胞，需在每5ml洗涤缓冲液Ⅰ（见配方）中加入50μl PMSF溶液。

PNA末端探针（单元14.10）

用无菌水稀释（PNA）FITC-$(CCCTAA)_4$探针（Applied Biosystems）至30μg/ml，4℃避光可保存1年。

用无菌水稀释（PNA）Cy3-$(CCCTAA)_3$探针（Applied Biosystems）至100μg/ml，每10μl一份，分装在1.5ml的微量离心管中，冷冻干燥后，－20℃储存。使用前在管中加入1ml无菌水，4℃保存。如果探针不能溶解，则可以50℃加热10 min促进溶解。冷冻干燥的探针可在－20℃长期保存，复溶的探针在4℃仅可保存6个月。

装有探针的管用铝箔密封，避光。

聚乙二醇，见 PEG

丽春红 S 溶液（单元 12.5）

溶解 0.5g 丽春红 S 于 1ml 的冰醋酸中。补加水至 100ml。使用前新鲜配制。

磷酸钾缓冲液，0.1mol/L

溶液 A：27.2g/L KH_2PO_4（0.2mol/L）

溶液 B：34.8g/L K_2HPO_4（0.2mol/L）

参照表 A.1.2 来配制所需 pH 的缓冲液，混合适当体积的溶液 A 和溶液 B，用水稀释至 200ml。如实验需要，可过滤除菌。室温可保存 3 个月以上。其他细节，参见磷酸钠缓冲液。

磷酸钾/氯化钠溶液（单元 13.2）

将 11.4g 三水合磷酸氢二钾（终浓度 50mmol/L）和 23.2g 氯化钠（终浓度 0.4mol/L）溶解于 950ml 水中。如果使用无水合磷酸氢二钾，则只需 8.8g。慢慢加入固体，避免结块，搅拌使之完全溶解。以浓盐酸调 pH 至 7.5。补加水至 1000ml。4℃密封，可保存 1 周以上。如存放于柱状容器中，添加 10mg 叠氮钠。封口，室温下可长期保存。

注意：叠氮钠有剧毒。

预杂交溶液（单元 14.4）

0.5mol/L 磷酸钠，pH7.0

7%（*m*/*V*）SDS

√10mmol/L EDTA

1%（*m*/*V*）牛血清白蛋白（BSA）

4℃保存

用于溶解 SDS 前需经 37℃预热。

预杂交溶液（单元 14.7）

50%甲酰胺

√5×SSC

√5×Denhardt 溶液

2%（*m*/*V*）SDS

200μg/ml 煮沸的青鱼精子 DNA

新鲜配制

预洗缓冲液（单元 14.10）

√9.80ml PBS

100μl 1mol/L 的 HEPES（Cellgrow 等）

100μl 10%（*m*/*V*）BSA 溶液

室温可保存 1 个月

引物（经 PAGE 或 HPLC 纯化制备）（单元 14.01）

Ts：5′-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3′（20μmol/L）

ACX：5′-GCG CGG CTT ACC CTT ACC CTT ACC CTA ACC-3′（20μmol/L）

NT：5′-ATC GCT TCT CGG CCT TTT-3′（20μmol/L）

TSNT：5′-AAT CCG TCG AGC AGA GTT AAA AGG CCG AGA AGC GAT-3′（0.1μmol/L）

R8：5′-AAT CCG TCG AGC AGA GTT [GGT TAG]$_8$-3′（0.1～1amol/μl）

Ts-TAMRA：5′-TAMRA-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3′（20μmol/L）

Pro-Q Diamond 磷蛋白胶染色液（单元 12.4）

从 Molecular Probes 购买 Pro-Q Diamond 磷蛋白胶染色液（1L 可供约 20 块小胶或 2 块大尺寸的 2-D 的胶染色）。避光，室温保存。如长期保存，请于 2～6℃避光保存。保存妥当的话，该染色液至少可使用 6 个月。

碘化丙啶（PI）溶液，50μg/ml（单元 4.1）

50μg/ml 碘化丙锭（PI）

0.1%（*m*/*V*）柠檬酸钠

4℃，避光保存 1 年

PI 储存液，1mg/ml（单元 4.1）

√PBS

1mg/ml 碘化丙锭

1mg/ml 核糖核酸酶 A（Sigma）

储存液在 4℃，避光条件下至多可保存 1 个月。使用前在工作液中加入 PI 至 10μg/ml，注意避光。

蛋白 A-琼脂糖，50%（*V*/*V*）悬液（单元 3.5）

加入 10ml 蛋白 A-Sepharose 4B（Sigma）至 50ml 锥形管中。用 30ml 的 0.0025%（*V*/*V*）Triton X-100 /25mmol/L HEPES，pH7.4 洗涤 4 次，每次洗涤后均于 4℃，1000*g* 离心 1min。取等体积的 0.025%（*V*/*V*）Triton X-100/25mmol/L HEPES，pH7.4 重悬凝胶颗粒，制成 50%（*V*/*V*）浆液。4℃保存数月。

蛋白酶 K 缓冲液（单元 14.8）

1.25ml 2 mol/L 氯化钾（终浓度 25mmol/L）

√1.0ml 1mol/L Tris·Cl，pH8.3（终浓度 20mmol/L）

0.125ml 1mol/L 氯化镁（终浓度 2.5mmol/L）

0.25ml Tween 20（终浓度 0.5%，*V*/*V*）

补加水至 50ml

室温保存

使用前加入蛋白酶 K，浓度为 0.1mg/ml（蛋白酶 K 不稳定）

蛋白酶 K 缓冲液（单元 14.10）

√1.0ml 1mol/L Tris·Cl，pH8

400μl 5 mol/L 氯化钠

√20ml 0.5mol/L EDTA

10ml 10%（*V*/*V*）月桂肌氨酸

68.6ml 水

室温可保存 1 年以上

使用前加入蛋白酶 K，浓度为 1mg/ml

胨蛋白胨，3%（单元 6.1）

蒸馏水中加入3%胨蛋白胨（Difco）。煮沸溶液，高压灭菌。4℃可保存3个月以上，使用前放置室温预热。如果出现混浊（可能被细菌污染），丢弃溶液。

重结晶 SDS（单元 12.3）

加入100g SDS至450ml乙醇中，加热至55℃。搅拌，加入55～75ml热水直至所有SDS溶解。加入10g活性炭（Norit1，Sigma # C2764）。10min后，用Whatman 5号滤纸在Buchner漏斗上除去活性炭。4℃下过滤24h或−20℃过滤24h。收集SDS晶体置于粗糙的多孔玻璃漏斗上，用800ml乙醇（−20℃，试剂级别纯度）冲洗。不加活性炭，再次重结晶。室温下，将干燥的重结晶SDS抽真空过夜。保存于深色瓶中，用P_2O_5干燥。

如果采用电泳或电印迹来进行蛋白质序列分析，建议通过乙醇/水重结晶SDS 2次（Hunkapiller *et al*.，1983）。

PWM 溶液（单 8.9）

根据使用说明分装商陆促分裂原（PWM；GIBCO/BRL）。用RPMI-10完全培养基（见配方）按1∶10（*V*/*V*）稀释。实验前先取1ml与已知标准品做对比，检定活性。−20℃保存。

RBC 裂解缓冲液（单元 8.19）

8.26g 氯化铵
1g 碳酸氢钾
0.037g EDTA
加入 ddH_2O 至1L
混匀，高压灭菌
4℃或室温可保存6个月以上
RBC裂解缓冲液可一直在室温下使用

重组人 GM-CSF（单元 8.18）

将1μg/ml粒细胞/巨噬细胞集落刺激因子（Genzyme）稀释（≤1∶5）到RPMI-10完全培养基（见配方）中，至终浓度80 000U/ml（100×储存液）。分装，−70℃保存。冻干粉剂复溶或稀释后可立即使用或保存。

重组人 IL-4（单元 8.18）

将10μg的重组人IL-4（Genzyme）用RPMI-10完全培养基稀释，至终浓度50 000U/ml（100×储存液）。分装，于−70℃保存。冻干粉剂复溶或稀释后可立即使用或保存。

重组人 TNF-α（单元 8.18）

将5μg的重组人TNF-α（Genzyme）用RPMI-10完全培养基稀释，至终浓度10 000U/ml（100×储存液）。分装成适当的体积，于−70℃保存。溶解后立即使用或冻存。

重悬缓冲液（单元 14.10）

√10ml 预洗缓冲液
2μl 100mg/ml RNase A（Qiagen 等）

0.2μl 500μg/ml LDS 751（用甲醇稀释）或 500μg/ml PI（用水稀释）

使用前配制新鲜的溶液。流式细胞仪检测前，溶液中加入杂交细胞，置于暗处，室温孵育 20min 以上。LDS751 是首选的 DNA 复染剂。

重悬缓冲液（单元 15.2）

√50mmol/L Tris·Cl，pH8.0
25%（*m/V*）蔗糖
√1mmol/L EDTA，pH8.0
0.1%（*m/V*）叠氮钠
使用前加入 DTT 至 10mmol/L

反转录酶缓冲液，5×（单元 14.5）

√250mmol/L Tris·Cl，pH8.3
375mmol/L 氯化钾
50mmol/L DTT
15mmol/L 氯化镁（GIBCO/BRL）
−20℃保存

反转录酶稀释缓冲液（单元 1.8）

10%（*V/V*）甘油
10mmol/L 磷酸钾，pH7.4
0.2%（*V/V*）Triton X-100
√2mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）
分装成 50ml 一份，−20℃保存

RPMI，见 RPMI 完全培养基和含添加物的 RPMI 培养基

RT-PCR 缓冲液，10×（单元 9.5）

√200mmol/L Tris·Cl，pH8.4
500mmol/L 氯化钾
−20℃长期保存

RT 反应缓冲液，5×（单元 14.7）

250mmol/L 氯化钾
√200mmol/L Tris·Cl，pH8.5
50mmol/L 氯化镁
2.5mmol/L 亚精胺
50mmol/L DTT
−80℃保存 1 年

皂苷，10×（单元 5.8）

√PBS-S/牛奶
1%（*m/V*）皂苷（Quillaja Bark；Sigma 或 Fluka）
4℃可保存 6 个月以上

饱和硫酸铵（单元 1.5，1.7 和 10.1）

76g 硫酸铵

100ml 水
加热（温度低于沸点），搅拌
室温放置过夜
室温保存
硫酸铵在100℃的溶解度为76g/100ml。

筛选稀释液（单元3.4）

6.18g 硼酸（终浓度100mmol/L）
9.54g 硼酸钠（终浓度47mmol/L）
4.38g 氯化钠（终浓度75mmol/L）
10g BSA（终浓度1%，*m/V*）
1g 叠氮钠（终浓度1%，*m/V*）
补加水至1L（pH在8.4～8.5）

SDS，20%（*m/V*）

将20g SDS（十二烷基硫酸钠或月桂基硫酸钠）溶解于水中，补水至100ml。必要的话，稍微加热溶液使SDS颗粒完全溶解。用0.45μm的滤器过滤。

SDS，见重结晶SDS

SDS/电泳缓冲液，5×（单元12.2和12.3）

15.1g Tris 碱
70.0g 甘氨酸
5.0g SDS
补加水至1000ml
使用前保存于0～4℃
稀释至1×工作液

当稀释后溶液pH为8.3时，不必调节pH。如果实验需要的话可使用重结晶的SDS（见配方）。配制不含SDS的上述溶液用于非变性胶。

SDS凝胶上样缓冲液，4×（单元3.5）

√200mmol/L Tris·Cl，pH6.8
7.5%（*m/V*）SDS
0.5mol/L DTT
30%（*V/V*）甘油
0.1%（*m/V*）溴酚蓝
分装成0.5ml/支，可在−20℃保存3个月。

SDS-PAGE磷酸盐凝胶上样缓冲液（单元1.8）

√25mmol/L Tris·Cl，pH6.7
√2%（*m/V*）SDS
10%（*V/V*）甘油
0.008%（*m/V*）溴酚蓝
4℃保存

SDS/上样缓冲液，2×（单元3.3、12.2～12.4、14.2和15.2）

√25ml 4×Tris · Cl，pH6.8

20ml 甘油

4g SDS

2ml 2-巯基乙醇或 3.1g DTT

1mg 溴酚蓝

加水至 100ml 并混匀

分装成 1ml/支，−70℃保存

如实验需要可使用重结晶的 SDS（见配方）。不使用 2-巯基乙醇或 DTT，以避免蛋白质分解；添加 0.01mol/L 的碘乙酰胺（IAM），以免发生二硫键互换。非变性胶需要配制不含 SDS 和还原剂的溶液。

二抗缓冲液（单元 5.2）

√20ml 25× PBS

0.25ml Tween 20

400ml 水

5g 牛血清白蛋白（BSA）

加水至 500ml

用 0.2μm 的滤器过滤

4℃可保存数周

致敏培养基（单元 2.10）

√RPMI-10 完全培养基包含：

1mmol/L 丙酮酸钠

1×非必需氨基酸

预先检测 FBS 是否能支持体外 CTL 产生。

硝酸银溶液（单元 12.4）

加入 3.5ml 浓缩的 NH_4OH（约 30%）至 42ml 的 0.36% NaOH 中，加水至 200ml。磁力搅拌，慢慢加入 8ml 的 19.4%（1.6g/8ml）硝酸银。20min 内使用。

如果溶液混浊，小心加入 NH_4OH 直至溶液变清。另外，可以使用 3 个月内配制的 NaOH。

注意：溶液变干时可能发生爆炸，因此添加一份等体积的 1mol/L HCl 来沉淀 Ag^+。残存的氯化银可随大量冷水冲洗排出。

载玻片盘（单元 2.5）

载玻片盘可以用半透明塑料材料（聚碳酸酯或聚丙烯）制成，使用无污染和抗腐蚀的材料，根据图 2.5.1 的尺寸来制作。在塑料板上切开两个 50mm 宽，3mm 深的槽，两槽间隔 12mm。各角上和中间的圆钉与托盘上的小孔相对应，以确保各托盘能够牢固地层层叠加。载玻片盘很坚固，易于清洗，可使用 10 年以上。在常规 PFC 实验中，载玻片盘是很有用的实验器具。

SOC 培养基（单元 14.3）

2g 蛋白胨

0.5g 酵母浸出物

0.05g 氯化钠
100ml 水
高压灭菌
冷却后，加入：
0.1ml 1mol/L 氯化镁（无菌）
0.1ml 1mol/L 氯化钾（无菌）
0.9ml 40%（*m/V*）葡萄糖，用 0.2μm 的滤器过滤
室温保存

乙酸钠，3mol/L

在 800ml 水中溶解 408g 三水合乙酸钠（$NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$）
用 3mol/L 的乙酸（表 A.1.1）调节 pH 至 4.8、5.0 或 5.2
加水至 1L
过滤除菌

乙酸钠，2mol/L（单元 1.8）

16.42g 乙酸钠（无水）
40ml 水
35ml 冰乙酸
用冰乙酸调 pH 至 4
加水至体积为 100ml
此处溶液的 2mol/L 是 Na^+ 浓度。

碳酸氢钠缓冲液，0.2mol/L，pH9.5（单元 2.5）

A：21.2g 碳酸钠/L 水（0.2mol/L Na_2CO_3）
B：16.8g 碳酸氢钠/L 水（0.2mol/L $NaHCO_3$）

4℃下每种溶液可保存 3 个月以上。使用前，将 13ml A 液与 37ml B 液混合。加水至 100ml（pH 约为 9.5）。

碳酸氢钠缓冲液（单元 14.3）

1L 水中加入 4.2g $NaHCO_3$，以 6mol/L NaOH 调节 pH 至 8.5。高压灭菌。室温保存。

碳酸钠，0.1mol/L（单元 13.2）

在 1000ml 水中溶解 10.6g 碳酸钠。室温可保存 1 周以上或于 4℃可保存 1 个月。

原钒酸钠，100mmol/L（单元 3.2）

将原钒酸钠粉末（Sigma）加入到保存于 15ml 管内的水中，颠倒混匀，室温振荡 5min，以充分溶解。使用前配制，置于冰上。

磷酸钠缓冲液，0.1mol/L

溶液 A：27.6g/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$（0.2mol/L）
溶液 B：53.65g/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$（0.2mol/L）

参照表 A.1.2 来确定所需的溶液 pH，混合溶液 A 和溶液 B，补水至 200ml。需要的话，过滤除菌。室温可保存 3 个月以上。

要配制在表 A.1.2 中列出的缓冲液，可以先配制最接近的但稍高于目的 pH 的缓

冲液，然后用溶液 A 滴定至所需 pH。

表 A.1.2 磷酸钠和磷酸钾缓冲液[a]的制备

pH	溶液 A/ml	溶液 B/ml	pH	溶液 A/ml	溶液 B/ml
5.7	93.5	6.5	6.9	45.0	55.0
5.8	92.0	8.0	7.0	39.0	61.0
5.9	90.0	10.0	7.1	33.0	67.0
6.0	87.7	12.3	7.2	28.0	72.0
6.1	85.0	15.0	7.3	23.0	77.0
6.2	81.5	18.5	7.4	19.0	81.0
6.3	77.5	22.5	7.5	16.0	84.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.5	68.5	31.5	7.7	10.5	90.5
6.6	62.5	37.5	7.8	8.5	91.5
6.7	56.5	43.5	7.9	7.0	93.0
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7

a. 经 CRC 于 1975 年修改。

缓冲液也可配制 5×或 10×浓缩液。因为磷酸缓冲液的 pH 根据浓度改变而变化，浓缩液稀释后应检测其 pH。

磷酸钠缓冲液，pH6.3（单元 12.1）

√50mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH6.3

√0.1%（*V/V*）Triton X-100（参见去垢剂储存液配方）

0.5mol/L 氯化钠

HRP 缓冲液（单元 8.11）

74ml 的 0.2mol/L 乙酸（11.55ml 冰乙酸/L；终浓度 15nmol/L）

176ml 的 0.2mol/L 乙酸钠（27.2g 三水乙酸钠，pH5.0）

4℃可保存 1 个月以上

可溶性底物（单元 8.11）

HRP 底物：溶解 20mg 3-氨基-9-乙基咔唑（AEC；Sigma；终浓度 38mmol/L）于 2.5ml 的二甲基甲酰胺（DMF；Sigma；终浓度 0.51mol/L）中，取 2.5ml 加入到 47.5ml 的 HRP 缓冲液（见配方）中，并搅拌。需要的话，可用 0.45μm 的滤器过滤去除多聚体。使用前加入 25μl 新鲜的 30%（*V/V*）H_2O_2（终浓度 0.015%）。

AP 底物：分别将 15mg 的 5-溴基-4-氯基-3-吲哚磷酸盐（BCIP；终浓度 0.4mmol/L）溶解于 1ml DMF（终浓度 2%）中，将 30mg 氮蓝四唑（NBT；Bio-Rad；终浓度 0.36mmol/L）溶解于 1ml 的 DMF 中。将 BCIP 和 NBT 溶液与 100ml 0.1mol/L 的 $NaHCO_3$/1.0mmol/L $MgCl_2$，pH9.8 溶液相混合。另外，可以使用预制的 BCIP 底物（Sigma）作为胶的底物（见配方），与蒸馏水按 1∶2 稀释。BCIP 或 BCIP/NBT 反应会产生蓝色斑点。

Sorensen 缓冲液，pH6.5（附录 3D）

A：9.474g/L Na_2HPO_4（0.15mol/L）

B：20.4g/L KH_2PO_4（0.15mol/L）

将265ml A液与735ml B液混合。检测pH（应该为6.5），可用A液或B液来调pH。缓冲液的pH必须在6.4～6.8。

SSC，20×（单元9.4、10.11和14.7）

3mol/L NaCl（175g/L）

0.3mol/L 柠檬酸三钠·$2H_2O$（88g/L）

用10mol/L NaOH调节该溶液pH至7.0

室温下可保存数月，临用前用水稀释成工作液

SSC，20×（单元14.10）

3mol/L NaCl

0.3mol/L 柠檬酸三钠

该溶液可在室温下保存1年

采用20% SDS储存液配制SSC/SDS溶液。如果SDS从溶液中析出，在使用前48℃加热溶液，使SDS溶解。

SSPE，20×（单元14.6）

3.6mol/L NaCl

2mol/L NaH_2PO_4

√0.02mol/L EDTA，pH7.7

SSPE，10×（单元14.7）

1.5mol/L NaCl

50mmol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

√5mmol/L EDTA

室温可长期保存

标记缓冲液（单元4.1）

√HBSS溶液，无酚红

0.1%（*m*/*V*）NaN_3

1.0%（*m*/*V*）BSA（组分V）

4℃保存，不超过1年

染色缓冲液（单元9.7）

√PBS，pH7.4

5mmol/L $C_6FeK_3N_6$（氰铁酸钾）

2mmol/L $MgCl_2$

4℃，暗处可保存数周

磷酸化蛋白凝胶的染色缓冲液（单元1.8）

50%（*V*/*V*）甲醇

7%（*V*/*V*）冰乙酸

0.02%（*m*/*V*）考马斯亮蓝

室温保存

终止液（单元14.6）

95%（V/V）甲酰胺

√20mmol/L EDTA

0.05%（m/V）溴酚蓝

0.05%（m/V）二甲苯青 FF

室温或4℃长期保存

底物缓冲液（单元5.7）

3.2g 柠檬酸

3.2g Na_2HPO_4（无水；0.09mol/L）

加水至200ml

以1mol/L NaOH 调节溶液 pH 至4.2

补加水至250ml

底物缓冲液（单元8.10）

1.69g $NaHCO_3$

2.51g Na_2CO_3

0.41g $MgCl_2$

加水至1950ml

以浓 NaOH 或 HCl 调节溶液 pH 至8.6

补加水至2L

底物溶液（单元5.2和5.4）

50mg 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉磺酸)（ABTS；Sigma；终浓度2mmol/L）

11ml 0.2mol/L $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$（终浓度40mmol/L）

7ml 0.2mol/L 柠檬酸（终浓度50mmol/L）

5ml 30% H_2O_2（终浓度2.7%）

32ml 水

使用前新鲜配制

分装后，可取一份底物液与一份稀释的 HRP 偶联剂反应，以测定活性。

底物溶液（单元8.12）

97ml 二乙醇胺

800ml 水

0.2g NaN_3

100mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

配制二乙醇胺缓冲液，将上述成分溶解后，以1mol/L HCl 调节溶液 pH 至9.8，补加水至1L，4℃暗处保存6个月。使用前，于室温下，将5mg 对硝基苯磷酸（Sigma；0℃储存，片剂）溶解于5ml 缓冲液中。

琥珀酰亚胺酯标记缓冲液（单元4.1）

0.1mol/L $NaHCO_3$

0.1mol/L NaCl

以浓 HCl 调节该溶液 pH 至8.4

室温保存1周

蔗糖/VSB（病毒标准缓冲液），15%（*m/V*）（单元 11.3）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.8

12mmol/L KCl

√5mmol/L Na_2EDTA

15%（*m/V*）蔗糖

高压或过滤灭菌

室温可保存6个月

含添加物的 EBSS 培养基（单元 5.12）

500ml 10×无酚红的 EBSS 培养基

50ml 10 000U/ml 青霉素/10 000μg 链霉素

140ml 7.5%（*V/V*）碳酸氢钠（$NaHCO_3$）

以浓 HCl 调溶液 pH 至 7.2～7.4

补加水至 5L

0.25μm 滤膜过滤除菌

4℃储存

采用低内毒素组织培养试剂。

此培养基的概要、成分和配制方法见本附录开始部分。

含添加物的 EMEM 培养基（单元 5.12）

500ml EMEM 培养基

5ml 200mmol/L L-谷氨酰胺

5ml 10 000U/ml 青霉素 /10 000μg 链霉素

0.5ml 10mg/ml 庆大霉素

7.5ml 1mol/L HEPES（以 0.9%生理盐水配制），pH7.2

14ml 7.5%（*V/V*）碳酸氢钠（$NaHCO_3$）

50ml FBS，热灭活（56℃，30min）

采用低内毒素组织培养试剂。

此培养基的概要、成分和配制方法见本附录开始部分。

含添加物的 EMEM 培养基（单元 6.1）

EMEM 培养基（如 GIBCO/BRL），加入：

2mmol/L 谷氨酰胺

15mmol/L HEPES 缓冲液

0.02%（*m/V*）碳酸氢钠

100IU/ml 青霉素

100μg/ml 链霉素

4℃可保存2个月

此培养基的概要、成分和配制方法见本附录开始部分。

含添加物的 HBSS 培养基，见 HBSS

含添加物的 Iscove/RPMI 培养基（单元 9.3）

IMDM 培养基或 RPMI 1640 培养基（Life Technologies），加入：

10%热灭活的人 AB +血清
2mmol/L L-谷氨酰胺
24μg/ml 庆大霉素
4℃可保存 2 周
此培养基的概要、成分和配制方法见本附录开始部分。

含添加物的 RPMI-10 培养基（单元 6.9）

RPMI 1640 培养基，加入：
10%（V/V）FBS（56℃热灭活 1h）
2mmol/L L-谷氨酰胺
30mmol/L HEPES
0.4%（V/V）碳酸氢钠
100U/ml 青霉素
100μg/ml 链霉素
4℃可保存 4 周
此培养基的概要、成分和配制方法见本附录开始部分。

吖啶橙或吖啶红荧光染色液（单元 12.4）

将装有吖啶橙或吖啶红蛋白胶染液的储存瓶（Molecular Probes）预热至室温，并快速离心使得二甲亚砜沉积到平底。如果染液中出现颗粒，预热后可短暂超声或剧烈振荡溶解颗粒。用 7.5%（V/V）乙酸按 1∶5000 稀释储存液，混匀。工作液保存在干净的无去垢剂的玻璃或塑料瓶中，4℃避光储存（染液可稳定保存 3 个月以上）。

吖啶橙荧光素：激发波长在 300nm 和 470nm 之间，发射波长为 570nm；SYPRO 红色荧光素：激发波长在 300nm 和 550nm 之间，发射波长为 630nm。

该储存液必须在室温，4℃或－20℃条件下避光保存，保存适当的话，其稳定性可达 6 个月至 1 年。

SYPRO Ruby 蛋白胶染液（单元 12.4）

可以从 Molecular Probes 购买 SYPRO Ruby 蛋白胶染液（200ml 染液可染 4 块微型凝胶），该染液需室温下避光保存（稳定性可达 9 个月以上）。

T 细胞培养基（单元 6.10）

RPMI 1640 添加：
10% FBS
15mmol/L HEPES
1∶100 非必需氨基酸（Life Technologies）
1∶100 必需氨基酸（Life Technologies）
4mmol/L 谷氨酰胺
55μmol/L 2-巯基乙醇
庆大霉素
此培养基的概要、成分和配制方法见本附录开始部分。

T4 DNA 连接酶缓冲液，2×（单元 14.2）

√100mmol/L Tris · Cl，pH7.5

20mmol/L $MgCl_2$

20mmol/L DTT

1mmol/L ATP（使用前加入）

加入酶的商品化的连接缓冲液，可以替代本溶液。

T4 DNA 连接酶缓冲液，10×（单元 14.4）

√0.5mol/L Tris·Cl，pH7.5

50mmol/L $MgCl_2$

50mmol/L DTT

0.5mg/ml BSA 或明胶

TAE 缓冲液（单元 14.7）

50×储存液：

242g Tris 碱（制成1×工作液时，浓度为 40mmol/L）

57.1g 冰乙酸（制成1×工作液时，浓度为 40mmol/L）

37.2g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$（制成1×工作液时，浓度为 2mmol/L）

补加水至1L（pH 约为 8.5）。

TAE 缓冲液，10×（单元 14.10）

400mmol/L Tris·乙酸盐

√10mmol/L EDTA

室温可保存1年

TB 培养基（单元 14.6）

12g Bacto 蛋白胨［Difco；终浓度为 1.2%（*m*/*V*）］

24g Bacto 酵母浸出物［Difco；终浓度为 2.4%（*m*/*V*）］

4ml 甘油［终浓度为 0.4%（*V*/*V*）］

加水至 900ml

高压灭菌 25min

加入 100ml 灭菌的 0.17mol/L KH_2PO_4 或 0.72mol/L K_2HPO_4

室温可保存2个月

TBE 缓冲液，10×（单元 14.10）

450mmol/L Tris-硼酸

√10mmol/L EDTA

室温下可保存1年

TBE 电泳缓冲液，10×（单元 14.6 和 14.8）

108g Tris 碱（890mmol/L）

55g 硼酸（890mmol/L）

√40ml 0.5mol/L EDTA，pH8.0（20mmol/L）

TBS（Tris 缓冲盐溶液）

√100mmol/L Tris·Cl，pH7.5

0.9%（*m*/*V*）NaCl

4℃可保存数月

TBS（单元 12.5）

√100mmol/L Tris · Cl，pH7.5

0.9% NaCl

4℃可保存数月

TBS，10×（单元 14.10）

√100mmol/L Tris · Cl，pH7.5

8.8g NaCl

室温可保存半年

TBST（单元 3.2）

√10mmol/L Tris · Cl，pH8.0

150mmol/L NaCl

0.05%（*V/V*）Tween 20

室温保存

TBST 缓冲液（单元 14.10）

√10ml 10×TBS 储存液

80μl Tween 20（Sigma 等）

90ml 水

新鲜配制

TBST 溶液，10×（单元 2.6）

61g Tris · Cl

87.6g NaCl

5ml Tween 20

定容至 1L

室温下可保存 6 个月

TE（Tris/EDTA）缓冲液

√10mmol/L Tris · Cl，pH7.4、7.5、7.6 或 8.0

√1mmol/L EDTA，pH8.0

室温下可保存 1 年

端粒酶反应缓冲液，10×（单元 14.10）

500mmol/L Tris-乙酸，pH8.5

100mmol/L $MgCl_2$

500mmol/L 乙酸钾

50mmol/L 2-巯基乙醇

10mmol/L 亚精胺

−20℃保存 1 年

TENC 裂解缓冲液（单元 9.4）

√50mmol/L Tris · Cl

√5mmol/L EDTA

150mmol/L NaCl

0.5%（m/V）3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸（CHAPS）

4℃长期保存

必须在其他试剂溶解后再加入CHAPS。

末端转移酶（TdT）缓冲液，5×（单元1.8）

√125mmol/L Tris·Cl，pH6.6

1mol/L 二甲砷酸钾

1.250mg/ml BSA

50μl一份分装，−20℃冻存

终止核苷酸混合剂（单元14.6）

配制一份终止混合剂，包含80μmol/L脱氧核苷酸（dNTP）和8μmol/L双脱氧核苷酸（ddNTP），溶解于50mmol/L NaCl溶液中，−20℃可保存1年。

TLB（Triton裂解缓冲液）（单元3.5）

2×储存液：

√40mmol/L Tris·Cl，pH7.4

274mmol/L NaCl

50mmol/L 甘油磷酸钠

4mmol/L 焦磷酸钠

√4mmol/L EDTA

20%（V/V）甘油

2%（V/V）Triton X-100

4℃保存1年

1×缓冲液：

使用前将储存液稀释至1×工作液，并加入：

1mmol/L 原钒酸钠（Sigma；取自100mmol/L储存液，分装，−20℃保存）

1mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF；Sigma；取自溶解在乙醇中的100mmol/L储存液，−20℃保存）

5μg/ml 亮抑酶肽（Sigma；取自10mg/ml储存液，分装，−20℃保存）

5μg/ml 抑蛋白酶肽（Sigma；取自10mg/ml储存液，分装，−20℃保存）

TMB-底物溶液（单元14.3）

选择四甲基联苯胺（TMB）的二氢氯盐片剂（Sigma-Aldrich或Amersham Pharmacia Biotech），加入新鲜配制的PCB溶液（见配方），终浓度1mg/ml。临用前在每10ml溶液中加入2μl 30%过氧化氢。

TN缓冲液，pH7.4，20×，1×（单元9.4）

20×储存液：

48.4g Tris碱

362g NaCl

59.3ml 6mol/L HCl

用水定容至2L即为20×储存液

室温下长期保存

配制 1×TN 工作缓冲液：将 20×储存液用水稀释配制。

TN-T 缓冲液，pH7.4（单元 9.4）

√50ml 20×TN 缓冲液
30ml 10%（*V*/*V*）Tween 20
920ml 水
室温长期保存

TN-TN 缓冲液，pH7.4（单元 9.4）

√50ml 20×TN 缓冲液
30ml 10%（*V*/*V*）Tween 20
5ml 10%（*V*/*V*）NP-40
915ml 水
室温长期保存

TNBS 溶液，10mmol/L（单元 2.10）

将 0.347g 2,4,6-三硝基苯（TNBS；Pierce）溶解在 100ml，pH7.4 的等渗 PBS 溶液（见配方）中，磁力搅拌器搅拌。TNBS 溶液的 pH 将会下降到 2.5，逐滴加入 10mol/L 或 1mol/L NaOH，期间用 pH 计检测，待溶液 pH 回升到 7.3，逐滴加入 NaOH，待上一滴 NaOH 加入，溶液 pH 改变后再加入下一滴 NaOH。当 pH 接近 6.0～6.5 时，以 1mol/L NaOH 滴加以免滴定过度。该溶液呈轻微的淡黄色，如果溶液已变黄，则必须丢弃，重新配制溶液。每 10ml 一份，分装在 15ml 的锥形塑料管中，−20℃冻存。如果使用 TNBS 进行体外刺激淋巴细胞实验，在冷冻前需过滤除菌。如溶液不适于室温下长时间保存，冻融的 TNBS 可至少再重新冷冻保存一次。

TNE（Tris/NaCl/EDTA）缓冲液（单元 3.6）

√25mmol/L Tris · Cl，pH7.4
150mmol/L NaCl
√5mmol/L EDTA
室温保存 1 年

TNE 缓冲液（单元 11.5）

10mmol/L Tris 碱
0.2mol/L NaCl
√1mmol/L EDTA
以 HCl 调节 pH 至 7.4
室温保存 1 年

TNE/P 缓冲液（单元 3.6）

√TNE 缓冲液
0.2mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF）
1μg/ml 亮抑酶肽
1μg/ml 抑胃酶肽

使用前，加入溶解在乙醇或甲醇中的 1000×蛋白酶抑制剂的储存液。溶解在乙醇中的 PMSF 储存液可在室温下保存 6 个月，亮抑酶肽和抑胃酶肽储存液可在−20℃保

存 6 个月。

TPK 缓冲液（单元 3.3）

20mmol/L 3-(N-吗啉代）丙磺酸（MOPS），pH7.0

5mmol/L $MgCl_2$ 或 5mmol/L $MnCl_2$

其中二价阳离子的选择依赖于不同 TPK 实验的活性，需要预先测定。

转膜缓冲液（单元 9.4）

57.6g 甘氨酸

12.12g Tris 碱

加水至 3200ml，充分溶解

加入 800ml 甲醇，混匀

每次新鲜配制

转移缓冲液（单元 12.5）

将 18.2g Tris 碱和 86.5g 甘氨酸溶解在 4L 水中，再加入 1200ml 甲醇，加水定容至 6L。该溶液 pH 须在 8.3～8.4，如使用 PVDF 滤膜，则要将甲醇浓度降低至 15%；使用尼龙膜，可以不用甲醇。

也可采用 CAPS 转移缓冲液，将 2.21g 3-(环己氨基)-1-丙磺酸（CAPS；游离酸），0.5g DTT 用水溶解，再加入 150ml 甲醇，最终用水定容至 1L，用 NaOH 调节该溶液 pH 至 10.5，4℃冷藏。对于分子质量>60kDa 的蛋白质，则要将甲醇浓度降低至 1%（Moos，1992）。

三乙醇胺溶液（单元 12.1）

50mmol/L 三乙醇胺，pH11.5

√0.1%（*V/V*）Triton X-100（见去垢剂储存液配方）

0.15mol/L NaCl

其他一些有机溶液如二乙醇胺可替代三乙醇胺。因为洗脱条件变化很大，所以应该测定每种抗体的最适 pH。

Tris 缓冲液，10mmol/L，pH7.5（单元 10.5）

1.21g Tris 碱

1ml Triton X-100

0.065g NaN_3

补加水至 1L

4℃可保存 30d

Tris-盐酸胍缓冲液（单元 10.3）

√50mmol/L Tris · Cl，pH7.4

5mol/L 盐酸胍

4℃保存 6 个月

Tris 缓冲盐溶液，见 TBS

Tris · Cl，1mol/L

将 121g Tris 碱溶解于 800ml 水中，以浓盐酸调溶液 pH 至所需的值，然后加水定容至 1L。如果实验需要，可过滤除菌。该溶液可在 4℃或室温下保存半年。

加入大约 70ml 的盐酸溶液 pH 可达到 7.4，加入 42ml 可达到 8.0。

注意：Tris 缓冲液的 pH 随温度变化较大，每降低 1℃，pH 约降低 0.028。所以需在溶液的使用温度下调节 Tris 缓冲液的 pH。此外，由于 Tris 的 pK_a 值为 8.08，因此它不能用于配制 pH 低于 7.2 或高于 9.0 的缓冲液。

4×Tris · Cl/SDS，pH6.8（单元 12.3）

将 6.05g Tris 碱溶解于 40ml 水中，以 1mol/L HCl 调 pH 至 6.8，再用水定容至 100ml。用 0.45μm 滤膜过滤，加入 0.4g SDS，4℃保存（Tris·Cl 终浓度为 0.5mol/L，SDS 终浓度为 0.4%）。

4×Tris · Cl/SDS，pH8.8（单元 12.3）

将 91g Tris 碱溶解于 300ml 水中，用 1mol/L HCl 调节 pH 至 8.8，再用水定容至 500ml。用 0.45μm 滤膜过滤，加入 2g SDS，4℃保存（Tris · Cl 终浓度为1.5mol/L，SDS 终浓度为 0.4%）。

Tris/NH_4Cl 裂解缓冲液（单元 2.4）

90ml 0.16mol/L（8.3g/L）NH_4Cl
√10ml 0.17mol/L Tris · Cl，pH7.65
用 HCl 调 pH 至 7.2
过滤除菌
室温可保存 3 个月

Tris/盐溶液/叠氮化物，见 TSA 溶液

Tris/Triton/NaCl 缓冲液，pH8.0 和 9.0（单元 12.1）

√50mmol/L Tris · Cl，pH8.0 或 pH9.0
√0.1%（*V/V*）Triton X-100（见去垢剂储存液配方）
0.5mol/L NaCl

Triton 裂解缓冲液，见 TLB

Triton X-100 缓冲液（单元 10.5）

5ml Triton X-100
0.065g NaN_3
√用 PBS 定容至 1L
4℃可保存 1 月

Triton X-100 裂解缓冲液（单元 12.2）

√TSA 溶液包含：
1%Triton X-100（室温避光保存）
1%牛血红蛋白（冷冻保存）
1mmol/L 碘乙酰胺（粉剂配制）
Aprotinin（0.2U/ml 胰蛋白酶抑制剂）
1mmol/L PMSF（用 100%乙醇溶解 PMSF，配制 100mmol/L 的储存液，可在 −20℃保存 6 个月）
新鲜配制
可用 4-(2-氨基）甲苯苯磺酰氟（AEBSF）替代 PMSF，使用前将加入 0.1mol/L

4-(2-氨基）甲苯苯磺酰氟储存液，至其终浓度为1mmol/L。AEBSF储存液可在4℃保存一年。

胰蛋白酶溶液（单元5.12）

√补充 EBSS
　0.25%（*m*/*V*）猪胰蛋白酶
　分装，−20℃冻存
　使用前，37℃融化

TSA（Tris/盐溶液/叠氮化物）溶液（单元3.2）

√50mmol/L Tris · Cl，pH7.6
　150mmol/L NaCl
　0.02%（*V*/*V*）NaN_3
　室温保存

TSA溶液（单元12.1和12.2）

√10mmol/L Tris · Cl，pH8.0（4℃保存）
　140mmol/L NaCl
　0.025%（*m*/*V*）NaN_3

TSE（Tris/NaCl/EDTA）溶液（单元14.1）

√50mmol/L Tris · Cl，pH7.8
　130mmol/L NaCl
√1mmol/L EDTA，pH8
　4℃可保存一年

TTBS（Tween 20/TBS）（单元12.5）

√TBS
　0.1%Tween 20
　4℃至多保存1周

尿素溶液（单元12.5）

　25mmol/L MES，pH6.0
　8mol/L 尿素
　10mmol/L EDTA
　使用前加入0.1mmol/L DTT

黏稠培养基（单元11.3）

在玻璃瓶中，将8.8g甲基纤维素（4000厘泊，Sigma）溶解于320ml双蒸水中，用磁力搅拌器搅拌均匀，121℃高压灭菌30min，将磁力搅拌子放置在烧瓶中，灭菌后继续搅拌直至甲基纤维素完全溶解（通常需几个小时）。然后在溶液中分别加入40ml 10×MEM或10×DMEM、40ml FBS、40 000U青霉素、40mg链霉素和4ml 1mol/L HEPES。根据培养基供应商推荐添加L-谷氨酰胺和碳酸氢钠。该培养基可在−20℃保存6个月。

当进行小鼠器官匀浆滴定时，需加入80mg庆大霉素和1mg两性霉素B。此外，也可采用一种西黄芪树胶溶液［1.6%（*m*/*V*），Sigma］与添加了FBS和抗生素（如上所

述）的 2×MEM 溶液按 1∶1（*V/V*）混合配制的混合液作为黏稠培养基。

洗涤缓冲液（单元 1.1）

√HBSS

1%（*m/V*）牛血清白蛋白（Sigma 或同等产品）

0.1%（*m/V*）NaN_3（Sigma 或同等产品）

洗涤缓冲液（单元 2.13）

HBSS（无酚红），含有：

1%（*m/V*）牛血清白蛋白（Sigma 或同等产品）

0.1%（*m/V*）NaN_3（Sigma 或同等产品）

洗涤缓冲液（单元 5.3）

Dulbecco PBS（D-PBS），含有：

0.05%（*m/V*）Tween 20

0.01%（*m/V*）乙基汞硫代水杨酸钠

室温下可保存两个月

洗涤缓冲液（单元 12.1）

√0.01mol/L Tris·Cl，pH8.0（4℃保存）

0.14mol/L NaCl

0.025%（*m/V*）NaN_3

√0.5%（*V/V*）Triton X-100（见去垢剂储存液配方）

√0.5%（*V/V*）去氧胆酸钠（见去垢剂储存液配方）

洗涤缓冲液（单元 12.2）

0.1%（*m/V*）Triton X-100（室温，暗处保存）

√50mmol/L Tris·Cl，pH7.4

300mmol/L NaCl

√5mmol/L EDTA

0.02%（*m/V*）叠氮钠

4℃保存 6 个月

洗涤缓冲液 I（单元 14.10）

√10ml 1mol/L Tris·Cl，pH8

√50ml 0.5mol/L EDTA

440ml 水

室温保存 1 年

洗涤缓冲液 II（单元 14.10）

√1ml 1mol/L Tris·Cl，pH7.5

1ml 10%（*m/V*）BSA 溶液

22.9ml 水

100μl Tween 20（Sigma）

75ml 甲酰胺

新鲜配制

使用前充分混匀

洗涤缓冲液 III（单元 14.10）

√100μl 1mol/L Tris · Cl，pH7.5

100μl 10%（*m*/*V*）BSA 溶液

100μl 1mol/L HEPES

9.69ml 水

10μl Tween 20

新鲜配制

使用前充分混匀

洗涤缓冲液 IV（单元 14.10）

√2.5ml 1mol/L Tris · Cl，pH7.5

175ml 甲酰胺

250mg BSA

73ml 水

使用前新鲜配制

洗涤缓冲液 V（单元 14.10）

10mmol/L HEPES · KOH，pH7.5

1.5mmol/L $MgCl_2$

10mmol/L KCl

1mmol/L DTT

新鲜配制

饱和酚溶液（单元 1.8）

把 100g 酚晶体溶解在 60～65℃的水中，吸出上层水相。该溶液可在 4℃保存一个月。切记不可用酚缓冲液替代水饱和酚溶液。

WBB（Western blotting 缓冲液）（单元 3.5）

√15mmol/L Tris · Cl，pH7.4

150mmol/L NaCl

4℃保存一年

工作缓冲液（附录 3D）

24ml Wrights 染液

√119ml Sorensen 缓冲液，pH6.5

购买商品化染液事宜可参考吉姆萨工作染液项。

吉姆萨工作染液（附录 3D）

10ml 吉姆萨染液（Columbia Diagnostics）

80ml 水

商品化的 Romanowsky 染液组分差异很大，即使是同一生产商的不同批次的产品组分也有差异。如果一种染液染色效果不好，则可采用另一种不同来源的染液。染液可长期储存。

WTB（Western 转膜缓冲液）（单元 3.5）

25mmol/L Tris

200mmol/L 甘氨酸

20% (V/V) 甲醇

室温保存 3 个月

Xgal，40mg/ml (单元 9.7)

用二甲基亚砜溶解 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷，配制终浓度为 40mg/ml 的溶液。分装，−20℃可保存数周。

YT 培养基，2× (单元 14.3)

16g 蛋白胨

10g 酵母浸出物

5g NaCl

加水至 1L

混匀各组分，高压灭菌 20min。当培养基冷却至 50℃以下时，加入抗生素（如 100μg/ml 氨苄青霉素和 50μg/ml 卡那霉素）和营养添加物（如葡萄糖）。

配制培养平板：每升 YT 培养基加入 18g 琼脂糖。

配制顶层琼脂：每升 YT 培养基加入 6g 琼脂糖。

高压灭菌后，储存在 100ml 烧瓶中，使用时用微波炉加热熔解琼脂糖粉，然后将烧瓶放置在 50℃的水浴中防止琼脂糖凝固。

YT 培养基，2× (单元 14.7)

16g Bacto 蛋白胨 (Difco)

10g Bacto 酵母浸出物 (Difco)

5g NaCl

补加水至 1L

调节 pH 至 7.0

高压灭菌 25min

室温下可长期储存

Z 缓冲液 (单元 9.7)

0.6mol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

0.4mol/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

0.1mol/L KCl

0.01mol/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0.5mol/L 2-巯基乙醇

−20℃可冻存数周

[张意 (附录 1)]

附录2 实验用小鼠、大鼠和仓鼠

附录2A 常用小鼠和大鼠品系

小鼠

表 A. 2A. 1 列出了常用的小鼠品系，以及这些小鼠表达的选择性细胞表面分子。1986 年 Klein 列出了比本表更详尽的小鼠品系表，并在 1990 年更新了其中的命名。*H-2* 基因位于小鼠第 17 号染色体上，编码主要组织相容性蛋白。本附录只列入参与了免疫反应的 *H-2* 基因位点，例如 *Aa*、*Ab*、*Ea* 和 *Eb* 区域编码 MHCII 类分子，而 *K*、*D* 区则编码 MHCI 类分子。其他一些临近 H-2 复合体的基因座也具有重要的功能。但不是所有的鼠系都表达 *Ea* 链（Hansen and Sachs，1989）。

除 *H-2* 基因座外，还有一些基因座编码重要的免疫蛋白。因为 *Thy-1* 和 *CD8* 基因座存在于两对等位基因上，所以在小鼠的 T 细胞分离实验（单元 2.2）和 $CD8^+$ 细胞摘除实验中，必须确证是抗 Thy-1 单抗还是抗 CD8 单抗发挥了参与作用。另外，*CD5* 和 *CD45* 也存在与两对等位基因上（Morse et al.,1987）。这些分子往往在特异性移植实验和移植物抗宿主反应中用于区分供者和受者的淋巴细胞，*Thy-1* 和 *CD8* 分子也可用于此类区分实验。

在表的第二部分列出了具有代表性的同类系小鼠，它们都是从原始品系小鼠（BALA/C，C57B1/10，C3H）通过选择性杂交而来，与原始品系的区别在于只有一个独立的遗传位点差异。这些特异性的基因就位于 *H-2* 上。同类系与原始品系的区别只在于 *H-2* 复合体的差异，而没有其他基因座差别。同类系小鼠的存在有助于深入研究 *H-2* 编码的 MHC 糖蛋白在胞内反应中的作用。

在同类系的产生过程中，还有几种品系起源于 *H-2* 复合体的内部重组。这些重组品系就不能用于区分各种 MHC 蛋白的作用。关于同类系和重组系小鼠的详细历史可以参见综述（Hansen and Sachs，1989）。

大鼠

大鼠是一种应用广泛的实验动物（Gill *et al.*,1989）。大鼠常用于需要在品系内和品系间进行大量数据对比以检测遗传效果的实验研究。关于大鼠的主要相容性复合体（MHC）已有介绍（Cortese Hassett *et al.*,1991；Gill *et al.*,1995）。大鼠 *MHC* 基因定位于第 20 号染色体（Locker *et al.*,1990）；*RT1. A*、*E*、*G*、*C* 是其 I 类基因位点，*RT1. B*、*D* 是 II 类基因位点。表 A. 2A. 2 中概括了主要的大鼠品系和它们的免疫遗传特性。其余信息可参见 Hedrich 的著作（1990）。关于近交系和重组的啮齿类动物品系的起源请参见表 A. 2A. 1。

表 A. 2A. 1　常用小鼠品系：H-2 单倍型和其他基因座

品系	单倍型	H-2复合体						其他基因座[a]			
		K	*Ab*	*Aa*	*Eb*	*Ea*	*D*	*Thy-1*	*CD5*	*CD8*	*CD45*
常用品系											
AKR/J	*k*	k	k	k	k	k	k	1	2	1	2
ASW/Sn	*s*	s	s	s	s	—	s	2	2	2	ND
C57BR	*k*	k	k	k	k	k	k	2	2	2	2
C57BL/10	*b*	b	b	b	b	—	b	2	2	2	2
C3H/HeJ	*k*	k	k	k	k	k	k	2	1	1	2
BALB/c	*d*	d	d	d	d	d	d	2	2	2	2
C57BL/6	*b*	b	b	b	b	—	b	2	2	2	2
CBA/J	*k*	k	k	k	k	k	k	2	1	2	2
DBA/2	*d*	d	d	d	d	d	d	2	1	1	2
SJL	*s*	s	s	s	s	—	s	2	2	2	1
P/J	*p*	p	p	p	p	p	p	ND	ND	ND	ND
RIII	*r*	r	r	r	r	r	r	ND	ND	ND	1
同类系											
BALB. B	*b*	b	b	b	b	—	b	2	2	2	ND
BALB. K	*k*	k	k	k	k	k	k	2	2	2	ND
B10. BR	*k*	k	k	k	k	k	k	2	2	2	ND
B10. D2	*d*	d	d	d	d	d	d	2	2	2	ND
B10. Q	*q*	q	q	q	q	—	q	2	2	2	ND
B10. S	*s*	s	s	s	s	—	s	2	2	2	ND
C3H. SW	*b*	b	b	b	b	—	b	2	1	1	ND
重组系											
A	*a*	k	k	k	k	k	d	2	2	2	2
A/J	*a*	k	k	k	k	k	d	2	2	2	2
A. TL	*tl*	s	k	k	k	k	d	2	2	2	ND
B10. A	*a*	k	k	k	k	k	d	2	2	2	2
B10. A(1R)	*h1*	k	k	k	k	k	b	2	2	2	2
B10. A(2R)	*h2*	k	k	k	k	k	b	2	2	2	2
B10. A(3R)	*i3*	b	b	b	b/k	k	d	2	2	2	1
B10. A(4R)	*h4*	k	k	k	k/b	b	b	2	2	2	1
B10. A(5R)	*i5*	b	b	b	b/k	k	d	2	2	2	2
B10. T(6R)	*y2*	q	q	q	q	—	d	2	2	2	2
B10. S(7R)	*t2*	s	s	s	s	—	d	2	2	2	2
B10. S(8R)	*as1*	k	k	k	k/s	—	s	2	2	2	2
B10. S(9R)	*t4*	s	s	s	s/k	k	d	2	2	2	2
B10. HTT	*t3*	s	s	s	s/k	k	d	2	2	2	2

a. ND，未测。

表中列出的大鼠品系均可以从 Tatsuji Nomura 博士处获取（Director of the Central

Institute for Experimental Animals，1430 Nogawa，Miyamae，Kawasaki 213，Japan)；也可以从 Carl T. Hansen 博士处获得（Building 14A，Room 102，National Institutes of Health，Bethesda，MD20892)。Charles River Laboratories 和 Harlan Bioproducts for Science 有商品化的动物产品供应。

参考文献：Klein，1986；Klein *et al.*，1990；Gill *et al.*，1992，1995

撰 稿 人：Ada M. Kruisbeek（小鼠)，Heinz W. Kunz and Thomas J. Gill III（大鼠)

表 A. 2A. 2 常用大鼠品系：RT1 单倍型和其他基因座

品系	单倍型	*RT1* 复合体[a]						其他基因座[a,b]			
		A	*B*	*D*	E^{c}	*G*	*C*	*RT2*	*RT3*	*RT6*	*RT7*
近交系											
ACI	*avl*	a	a	a	—	ND	ND	b	a	ND	ND
DA	*avl*	a	a	a	—	c	a	b	a	a	b
BUF	*b*	b	b	b	—	c	ND	a	a	a	b
PVG	*c*	c	c	c	u	c	c	b	a	a	ND
BDIX	*dvl*	d	d	d	—	a	ND	b	b	b	a
SHR	*k*	k	k	k	—	ND	ND	b	b	a	a
LEW	*l*	l	l	l	—	a	l	a	a	a	a
F344	*lvl*	l	l	l	—	c	ND	a	b	b	a
WKY	l^{d}	l	l	l	—	ND	ND	a	b	b	a
BN	*n*	n	n	n	—	c	ND	a	b	b	a
BB	*u*	u	u	u	u	ND	ND	b	b	a	a
LOU/C	*u*	u	u	u	ND	ND	ND	b	a	b	b
WAG	*u*	u	u	u	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
WF	*u*	u	u	u	u	c	u	b	b	b	b
同类系											
BN. 1(LEW)	*l*	l	l	l	—	a	l	a	b	b	a
LEW. 1A(AVN)	*a*	a	a	a	ND	ND	ND	a	a	a	a
LEW. 1AV1(DA)	*avl*	a	a	a	—	c	a	a	a	a	a
LEW. 1F(AS2)	*f*	f	f	f	—	c	ND	a	a	a	a
LEW. 1N(BN)	*n*	n	n	n	—	c	ND	a	a	a	a
LEW. 1W(WP)	*u*	u	u	u	u	ND	ND	a	a	a	a
PVG-RT1[avl](DA)	*avl*	a	a	a	ND	ND	ND	b	a	a	ND
PVG-RT1[u](AO)	*u*	u	u	u	ND	ND	ND	b	a	a	ND
无胸腺的同类系											
F344-rnu/+	*rnu*	l	l	l	—	c	ND	a	b	b	a
LEW-rnu/+	*rnu*	l	l	l	—	a	l	a	a	a	a
WAG-rnu/+	*rnu*	u	l	l	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

续表

品系	单倍型	RT1复合体[a]						其他基因座[a,b]			
		A	*B*	*D*	*E*[c]	*G*	*C*	*RT2*	*RT3*	*RT6*	*RT7*
重组系[e]											
R16	*r16*	a	a	a	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R21	*r21*	l	l	l	u	c	ND	ND	ND	ND	ND
R33	*r33*	a	a	a	u	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R34	*r34*	a	a	a	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
重组单倍型的同类系											
LEW. 1AR1	*r2*	a	u	u	ND	ND	u	a	a	a	a
LEW. 1AR2	*r3*	a	a	a	ND	ND	u	a	a	a	a
LEW. 1WR1	*r4*	u	u	u	ND	ND	a	a	a	a	a
LEW. 1WR2	*r6*	u	a	a	ND	ND	a	a	a	a	a
PVG. 1R1	*r1*	a	c	c	ND	ND	c	b	a	a	ND
PVG. 1R8	*r8*	a	u	u	u	ND	u	b	a	a	ND
PVG. 1R19	*r19*	a	a	a	ND	ND	c	b	a	a	ND
PVG. 1R20	*r20*	c	c	c	ND	ND	a	b	a	a	ND

a. ND，未测。

b. RT2 和 RT3 是血液抗原，RT6 和 RT7 是淋巴细胞分化抗原。

c. RT1. E 是等位基因，有 u 和—。

d. 一些 WKY 杂交系有 *k* 单倍型。

e. 参见 Melhem *et al*.，1993。

附录 2B　饲养

居住环境对于实验动物具有重要作用，可以影响动物的健康、动物对实验操作的反应。环境中的多种变量和污染物会严重干扰实验动物的免疫功能。本单元将介绍实验动物（小鼠、大鼠、兔、仓鼠）的饲养措施，遵守这些措施可以保证动物的健康，并最大可能减少实验参数的变化与波动。

笼具

各种实验动物的笼具必须至少保证动物具有行动和体位调整的自由（最小饲养空间见表 A. 2B. 1）。重要的是，在实验开始时需要考虑时间跨度，确定所需的笼具。如实验开始时，因考虑不周导致实验结束时笼具数量不足，笼养动物有时会出现不适当的焦虑，导致实验结果的波动。

适于建造笼具的材料很多，有不锈钢、聚丙烯、聚碳酸酯。每种材料都有各自的特点和用处。由高强度、耐磨的材料制成的高质量笼具，彼此之间交叉感染概率小，表面光滑密闭，不易有灰尘残留，易清洁，便于饲养者给动物喂水和食物。笼具应该具有充

表 A. 2B. 1　饲养实验动物的笼具所需的最小空间[a]

动物	体重/g	地面面积/动物		笼高[b]	
		/m^2	/cm^2	/in	/cm
小鼠	＜10	6.0	38.71	5	12.70
	10～15	8.0	51.62	5	12.70
	15～25	12.0	77.42	5	12.70
	＞25	15.0	96.78	5	12.70
大鼠	＜100	17.0	109.68	7	17.78
	100～200	23.0	148.40	7	17.78
	200～300	29.0	187.11	7	17.78
	300～400	40.0	258.08	7	17.78
	400～500	60.0	387.12	7	17.78
	＞500	70.0	451.64	7	17.78
仓鼠[c]	＜60	10.0	64.52	6	15.24
	60～80	13.0	83.88	6	15.24
	80～100	16.0	103.23	6	15.24
	＞100	19.0	122.59	6	15.24

a. 引自 ILAR（1985）。

b. 从地面到笼顶。

c. 推荐空间参照美国现行的动物福利法案，怀孕的母鼠需要更大的空间（CFR1990）。

分的通风条件，保持动物清洁干燥，并能使饲养者无阻碍地观察动物（ILAR，1985）。笼具应该定期维护、修复与替换，以避免动物受伤。

喂养

标准饲料可制成丸状、压缩状或条状。饲料中要包含动物生长所需的足够营养成分。饲料可以是天然食物、提炼或合成的食物。饮食一般应该足量，但近来有限制的饮食方法得到越来越多的赞同。有证据表明减少碳水化合物的摄入可以延长啮齿类动物的寿命，减缓衰老，减轻生殖期的损害。根据实验所需，饲料成分要进行生化检测，以避免那些影响生理反应的物质摄入。

因为存储条件和材料的不同，用于动物喂食的饲料寿命差异很大。冷藏和控制湿度可以有效延长饲料寿命。一些维生素（如维生素 C）非常不稳定，在冷藏条件下都可以在 90d 之内完全变性。喂养时需要注意饲料的生产日期，定期清除腐烂变质的饲料。

垫料

动物的笼具内可以铺设垫料。底部坚实的笼具可以在下部铺设接触性垫料，而悬挂的笼具底部则可铺设非接触的垫料。接触性的垫料保暖，吸收尿液和水分，常由某些网状材料制成。通常使用的材料包括玉米秸秆、碎木屑、堆积的花生壳、苜蓿叶、碎纸片、木条、纸条等。垫料铺设的地方要防止寄生虫和化学物质的污染，并保持干燥。由红松、黄松、白松木屑制成的垫料含有多种芳香族化合物，会导致啮齿类动物肝脏内微

粒体酶活化，进而导致实验结果不准确。通常没有显著副作用的木料有白杨、桦树、山毛榉和枫树（Fox *et al*.，1984）。

水

饲养必须连续提供新鲜的清洁饮水。含有矿物质、化学物质和细菌污染的饮水会引起实验结果变化。纯化水的系统，如双重蒸馏、反渗透和超滤等装置，可以用于饲养时的饮水净化。高氯和高酸的水可以抑制水中的细菌生长，但会影响动物生理状况（Fox *et al*.,1984）。

卫生措施

规律的卫生措施可以将环境污染对动物居住空间的影响减少到最小。清扫频率视笼养类型和垫料数目而定。无论何种垫料，一般建议每周更换两或三次，以减少氨的积聚和细菌污染。更换时，将垫料取出，堆积到饲养房外，以减少有害微生物在房间内空气中悬浮。每周至少清扫、消毒笼具一次。动物饲养房地面每天清扫，所有房间每月清扫一次。

下班后应急措施

兽医的姓名和电话号码要贴在动物笼具旁和安全办公室内，这是应对紧急情况的必要手段。每天，包括节假日和周末，都必须有专人观察、照料动物。

环境监控和评价

维持、监控环境中的温度、湿度、通风和照明条件对稳定动物的代谢和行为都很重要。建议动物房的通风率为每小时能进行 10～15 间的空气交换，这个水平能保证足够的氧气、散热和稀释空气污染所需。动物房内一般不使用循环空气，除非有充分的处理和过滤措施。通常每日光照强度（依种属不同而异）为 323lux/m（ILAR，1985）。

参考文献：Fox *et al*.，1984a；ILAR，1985

撰 稿 人：John Donovan，Patricia Brown

附录 2C　处理和捕捉

每种动物的行为特征决定了它对处理和捕捉的反应。无论操作何种实验动物，都必须采取迅速、轻柔的方法。为了操作者和动物的安全，应该严格遵守正确的处理和捕捉方法。不正确的操作会导致动物紧张、受伤。另外，动物惊恐或激怒时往往会咬伤、抓伤操作者。

为了安全，只有采用迅速、正确的方法，才能便于处理、捕捉实验动物。这种精心细致的操作，是实验人员所必需的，可以在熟练的实验人员的指导下进行以获得经验。有很多实验动物机构会提供相关的操作技术培训，以使不熟练的工作者获取必要的经验。

在打开笼具前，要注意不要用噪声和猛烈的动作刺激动物。操作者的惊慌失措会给动物带来不良影响。如果不注意捕捉方法，一旦动物发生过分兴奋、惊惧，这种焦虑会改变生理参数，影响实验结果。发生这种情况后，要立即停止操作，让动物松弛下来，准备第二天再进行实验；或至少在几小时后进行实验。

注意：必须戴手套进行处理和捕捉。

基本方案 1　小鼠的处理和捕捉

小鼠通常比较温顺，但被激怒后也会咬人。正确的操作会让它们更加温驯。某些品系和野生小鼠则会比较难以处理和捕捉。

1. 首先用优势手温柔地抓住小鼠的尾巴，将其从笼中取出。将动物放置在笼盖的栅栏上，向后轻微的牵拉尾巴（图 A. 2C. 1A）。避免用噪声和猛烈动作激怒动物。
2. 用另一只手的拇指和食指从后颈部抓住耳后皮肤（图 A. 2C. 1B）。将尾巴从优势手移出来，用另一只手的小指压住（图 A. 2C. 1C）。
3. 观察或注射动物。

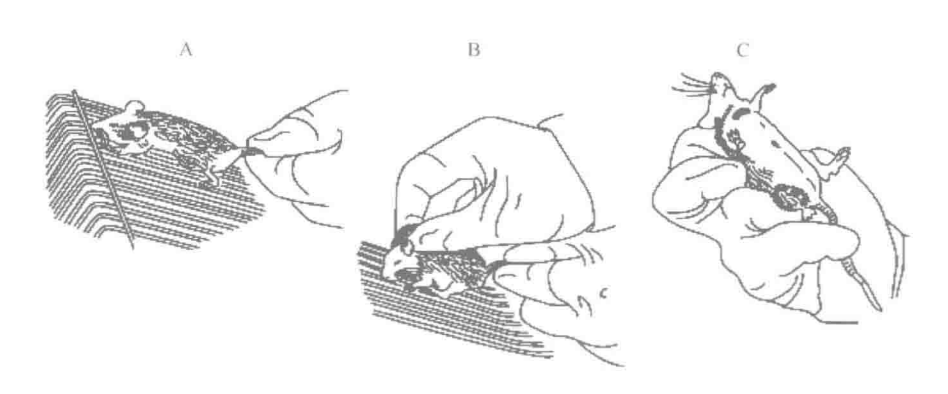


图 A. 2C. 1　小鼠处理和捕捉。A. 拉住尾巴向后轻轻牵拉；B. 用拇指和食指温柔抓住耳后皮肤；C. 把尾巴移到另一只手的小指下。

基本方案 2　大鼠的处理和捕捉

大鼠比小鼠和仓鼠更为温顺驯良。使用正规、熟练的操作，大鼠基本会保持平静，至多有轻微挣扎。

注意：除非实验必要，否则操作成年大鼠时不能牵拉其尾巴。

1. 用拇指和中指从大鼠前肢的后部温柔的抓住围胸部，将其从笼中取出（图 A. 2C. 2A）。
2. 用中指、无名指和小指继续握住大鼠。以拇指和食指抓住颈、背部松弛的皮肤（图 A. 2C. 2A）。
3. 观察或注射大鼠。

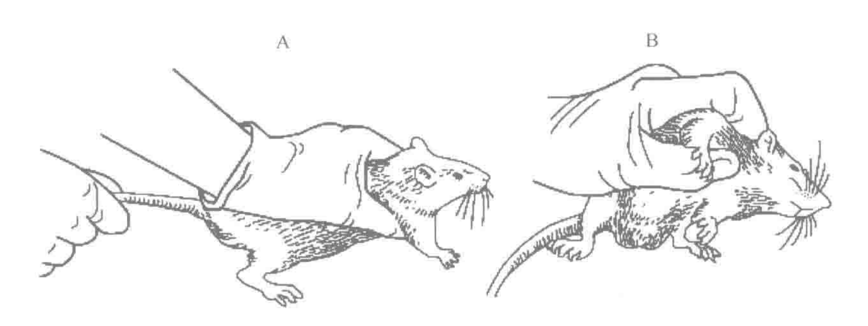


图 A. 2C. 2　大鼠的处理和捕捉。A. 从前肢后部用拇指和中指抓住胸部。B. 用拇指（依然处于动物前肢下部）和食指抓住颈后松弛的皮肤。

基本方案 3　仓鼠的处理和捕捉

仓鼠是一种易于被激怒的夜行性动物，当被惊扰或睡眠被打扰时常会咬人。雌性仓鼠，尤其是怀孕的母鼠，比雄鼠更具有攻击性。熟练、轻柔的处理有助于操作进行。

1. 让仓鼠从笼中爬入一个小杯子或容器内。耐心的等待其躺在光滑的平面上。避免惊扰动物。
2. 从后面接近动物，把手平放在动物身上，拇指靠近头部（图 A. 2C. 3A），慢慢捏紧手指，抓住颈部和后背松弛的皮肤（图 A. 2C. 3B）。同一只手握住动物身体，慢慢托起动物。
3. 观察或注射动物。



图 A. 2C. 3　仓鼠的处理和捕捉。A. 手向下放在仓鼠身上；B. 抓住颈部和后背部松弛皮肤，手紧握头部，以便胸腹部皮肤展开。抓住更多的皮肤，可以减少动物挣扎，保证实验安全。

备选方案　啮齿类动物捕捉器

塑料捕捉器具有各种尺寸和形状，具备多种用途，图 A. 2C. 4 中列出了其基本用法。该装置的尺寸必须能够防止动物翻身，但需保证其正常呼吸。注意绝大多数捕鼠器都不能保证动物充分散热，这会导致动物躯体的温度上升。

1. 准备一个干净、完好的捕鼠器，打开器具。
2. 按基本操作要求捕捉小鼠、大鼠或仓鼠。
3. 握住尾巴，把动物的头部放在进口处（图 A. 2C. 4）。
4. 松开动物胸部，继续抓紧其尾巴。
5. 待动物完全进入捕鼠器后，插上安全栅栏。

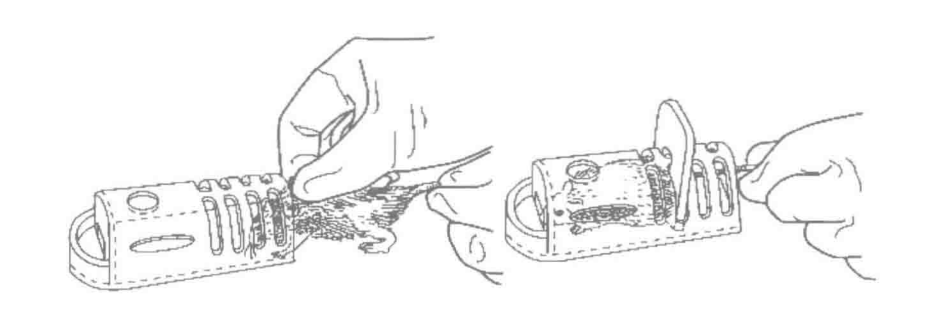


图 A. 2C. 4　捕鼠器。当动物已按前述方法被控制，将其头部放在进口处，牵拉其尾巴给予张力。让动物爬入器具，放下栅栏。

参考文献：Fox *et al.*，1984b；Scobie-Trumper，1987

撰 稿 人：John Donovan and Patricia Brown

附录 2D　麻醉

麻醉剂在实验过程中常用于预防痛苦、焦虑。对啮齿类动物而言，麻醉是一种较困难的操作。麻醉剂可以单独使用，也可以联合使用。麻醉、无痛镇静及安静，这些是使用麻醉剂所要达到的效果；而达到这些效果必须要有精确的麻醉剂量。使用时必须清楚所使用麻醉剂的生理作用和危险。

最常用的麻醉啮齿类动物的方法是腹腔内注射，因为操作简单，使用安全，吸收均匀，可预测诱导麻醉和恢复时间。肌肉注射对啮齿类动物比较困难，因为其肌肉组织微小，难以预测诱导时间，耐受时间和作用强度也都难以预测。静脉注射需要熟练的技术，其诱导进程快，恢复时间也短。操作中剂量必须仔细计算以保证麻醉效果，注意不能过量。皮下注射虽然安全但吸收缓慢且不均匀，麻醉程度也难以预测。因为啮齿类动物体积小，所以麻醉剂往往需要稀释 5～10 倍使用以发挥药效。

吸入麻醉剂已在临床上应用，但其中大多数对啮齿类动物并不适合。最常用于啮齿动物的是甲氧氟烷、乙醚和异氟醚。正如基本方案 2 中的提示所表明，对啮齿类动物，甲氧氟烷是最常用和安全的麻醉剂。而乙醚和异氟醚一般不建议使用。

在注射时往往需要补充麻醉剂，如在注射三溴乙醇时可以伴随吸入甲氧氟烷。此时较之继续输入小剂量的注射剂，更为合理的措施就是吸入麻醉剂。因为对一些常用注射麻醉剂来说，安全注射剂量与致死剂量非常接近。

呼吸的频率和深度可用于粗略评价心肺功能。诱导期、恢复期和不充分的麻醉往往表现为快速和不规则的呼吸，而充分的麻醉则出现缓慢和规则的呼吸。刺激，如挤压动物脚趾，可以检测动物后肢的松弛程度；而在深度麻醉之前，予以刺激，都可以导致动物快速的呼吸和运动。

外科手术进程会导致大量体液通过出血和挥发而丧失。补偿治疗（如生理盐水和平衡电解质溶液输入）的目的是为了使动物迅速从麻醉和手术中恢复。关于剂量和补偿措施可向兽医咨询。

小型啮齿类动物相对自身体重，具有更大的体表面积而易于散热。冷的容器和不锈钢操作台易于传导热量。麻醉和恢复中的动物都需要处在温暖的环境中。另外，注意保持动物的气道通畅，没有碎屑，如可以轻柔拉伸其下颚和颈部。

恢复中的动物应该每 5～10min 翻身一次，以促进其迅速恢复。最后，应该仔细观察动物，直到其几乎完全清醒；此时的动物能够保持胸式呼吸，移动自如而不会摔倒。

基本方案 1　小鼠、大鼠和仓鼠的注射麻醉

材料

小鼠、大鼠、仓鼠
麻醉选择（表 A. 2D. 1 和表 A. 2D. 2）
天平，称量动物体重
1ml 或 3ml 的注射器，配以 22G 针头

1. 把动物从笼中取出，放置于一个称量的广口瓶中，称重，计算恰当的麻醉剂量。
2. 常规方法捕捉动物。腹腔内注射。
3. 把动物放回笼中，观察其麻醉程度。

表 A. 2D. 1　啮齿类动物腹腔内麻醉注射指导

试剂和组合	种属	剂量/（mg/kg）	持续时间/min
戊巴比妥[a]	小鼠	40～70	30～60
	大鼠	30～40	30～60
	仓鼠	50～90	30～60
克他明＋甲苯噻嗪[b]	小鼠	50～150	15～20
	大鼠	50～150	15～20
	仓鼠	50～150	15～20
三溴乙醇[c]	小鼠	125～160	15～30
	大鼠	300	15～20

a. 无菌盐溶液按 1∶10 稀释，作为对照物。

b. 加 1.0ml 甲苯噻嗪（20mg/ml）到 10ml 克他明（100mg/ml）中，混合后的混合剂的剂量是 100mg/ml，用无菌的生理盐溶液按 1∶10 稀释，以精确剂量麻醉小鼠、仓鼠和年幼大鼠。此麻醉混合剂使用两种麻醉剂的储存液商品（有多个公司出售；见下表）配制而成，不能用两种化合物直接配制。如果使用未灭菌的化合物干粉配制，会在制作过程中带来细菌和其他污染。应当从兽医组织或有美国动物处理和使用委员会认证的单位购买麻醉剂。一些研究机构经美国药品执行局认证可以使用麻醉剂和其他兽药。在其他机构中，每一个操作的研究人员必须经过 DAE 的认证。

c. 以 5ml 2′-甲基-2′-丁醇配置 100％的三溴乙醇储存液。缓缓加热。在生理盐水中以 1∶250 稀释（4mg/ml）成工作溶液；4℃，黑色瓶中保存 4～6 个月。

表 A. 2D. 2　麻醉剂来源

麻醉剂	商品名	供应商
苯巴比妥盐 II 代产品	盐酸苯巴比妥注射液	Butler
麻醉剂，65mg/ml	盐酸苯巴比妥注射液	J. A. Webster
盐酸克他明	Ketaject	Phoenix Pharmaceutical
注射，100mg/ml	Ketaset	Fort Dodge Labs
	Ketaved	Vedco
	Vetalar	Fort Dodge Labs
盐酸甲苯噻嗪	Anased Injection (Dogs)	Lloyd Labs
20mg/ml	Gemini SA	Vetus Animal Health
	Rompun 20mg/ml Injectable	Bayer
	Solvazine 20mg/m	Fort Dodge Labs
	Tranquived Injectable (Dogs)	Vedco
	Xyla-ject Canine/Feline Injectable	Phoenix Pharmaceutical
	Xylazine-20 Injection	Butler
三溴乙醇	2,2,2-Tribroethanol and tert-armyl alcohol	Commercial chemical supply houses (Aldrich or Sigma)

基本方案 2　用甲氧氟烷吸入法麻醉小鼠、大鼠和仓鼠

对啮齿动物，甲氧氟烷是一种相对安全的麻醉剂，使用方便，无需其他特殊装置，室温下其散发的蒸气适用于常规麻醉。

材料

小鼠、大鼠、仓鼠
甲氧氟烷
纱布或棉球
带活动层的封口玻璃容器
空注射器或 50ml 离心管

注意：所有甲氧氟烷的操作都必须在通风槽或通风橱中进行以保证麻醉气体不影响实验人员。

1. 将甲氧氟烷倒在纱布或棉球上，把浸润的材料放在封闭的玻璃容器底部。把活动层放在纱布上，逐渐向上提升以便蒸汽逐渐充满容器。把盖子盖上 3～5min 让甲氧氟烷完全蒸发。
2. 把啮齿动物放在活动层上，关闭容器，观察动物，待动物斜靠瓶壁慢慢躺下，呼吸规则，从容器中取出动物，进行下一步实验操作。
3. 需要延长麻醉时，把甲氧氟烷浸泡的纱布或棉球放在空的针管或 50ml 离心管底部，制造一个“鼻锥”。打开封口，用鼻锥罩住动物鼻子（图 A. 2D. 1）。待充分麻醉后移

开鼻锥。

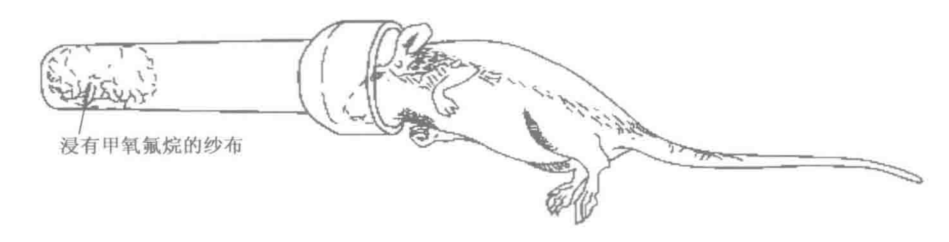


图 A. 2D. 1　甲氧氟烷的鼻吸入麻醉。

参考文献：Green，1987；White and Field，1987；Wixson and Smiler，1997

撰 稿 人：John Donovan and Patricia Brown

附录 2E　腹腔注射

必须了解所有注射液的理化成分。考虑其 pH、黏稠度、浓度、灭菌状态、致热原和其他有害物质。失败的操作往往来自于感染、炎症或其他有害的免疫和生化反应。注射剂的剂量和温度也很重要，过量会给动物带来痛苦。注射剂量可参见表 A. 2E. 1。正确的捕捉和注射手法能够减小动物的疼痛和焦虑，保证成功给药。在初次操作前需在熟练技术人员的指导下进行。在熟练掌握技术之前需多次练习，以积累经验。

注意： 操作必须戴手套。

表 A. 2E. 1　最大注射量（单位：ml）[a]

种属	皮下注射	肌肉注射	腹膜内注射	静脉注射	皮内注射
小鼠	2～3	0.05	2～3	0.2	0.05
大鼠	5～10	0.3	5～10	0.5	0.05
仓鼠	3～4	0.1	3～4	0.3	0.05

a. 经 Tuffery 修改，1987。

基本方案 1　小鼠、大鼠和仓鼠的肌肉注射

材料

小鼠、大鼠、仓鼠

注射剂

3ml 注射器，带 22G～32G 针头

1. 将注射剂注入针筒，排除气泡。
2. 捕捉动物（附录 2C）。将针头扎入大腿上部大肌群中（图 A. 2E. 1）。操作大鼠时，可以两人进行操作，一人捕捉，另一人在注射时固定后腿。
3. 在注射前回吸以避免插入静脉或动脉内。
4. 轻柔用力，避免组织损伤。

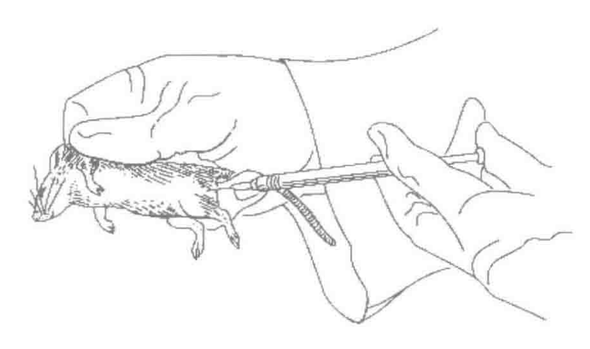


图 A. 2E. 1　小鼠的肌肉注射。

基本方案 2　小鼠、大鼠和仓鼠的皮内注射

材料

小鼠、大鼠、仓鼠
70%乙醇
注射剂
剪刀，40＃刀片
纱布或药棉
3ml 注射器，带 25G～32G 针头

1. 捕捉（附录 2C）和麻醉动物（附录 2D）。
2. 以刀片刮去待注射的背部区域毛发，并以 70%乙醇浸润的纱布或药棉擦洗皮肤。
3. 将注射剂注入针筒，排除气泡。
4. 一手绷紧皮肤，以锐角斜面向上插入针头，进针在真皮层上。
5. 注射 50μl，在注射点产生一个小泡。对仓鼠，避免注射入其腹部腺体区域（两侧的暗黑色区域，臀部上方）。
6. 需要注射多个位点时，选定足够的独立注射区域，避免各注射点交叉重叠，尤其在注射佐剂时更需注意。

基本方案 3　小鼠、大鼠和仓鼠的皮下注射

材料

小鼠、大鼠、仓鼠
注射剂
3ml 注射器，带 22G～32G 针头

1. 将注射剂冲入针筒，排除气泡。
2. 捕捉小鼠、大鼠和仓鼠（附录 2C）。将药剂注入拇指和食指之间的肩胛区域（图 A. 2E. 2）。
3. 轻柔用力，避免组织损伤。

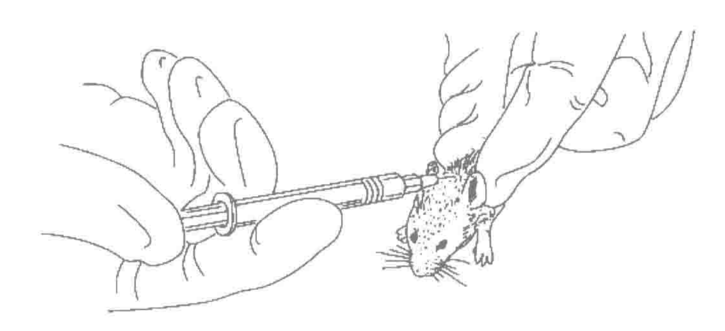


图 A. 2E. 2　小鼠的皮下注射。

基本方案 4　小鼠的静脉注射

静脉注射小鼠是一项很困难的操作，需要经验和耐心。不熟练的操作人员可以用 PBS 代替注射剂进行模拟操作来获得经验。

材料

小鼠
注射剂
70%乙醇
1ml 注射器，带 25～30G 针头
捕鼠器（附录 2C）
加热灯或盛有温水的大口杯
纱布或药签

1. 将注射剂冲入针筒，排除气泡（必须）以避免空气栓塞。
2. 将鼠放入捕鼠器中。
3. 灯照尾巴或将尾巴浸入温水中。以 70%乙醇浸润的纱布或药棉擦洗。
4. 固定尾巴，露出侧面的静脉，针头先插入 2～4mm 进入静脉内腔，尽可能地抓紧尾巴，斜面向上插入（图 A. 2E. 3）。

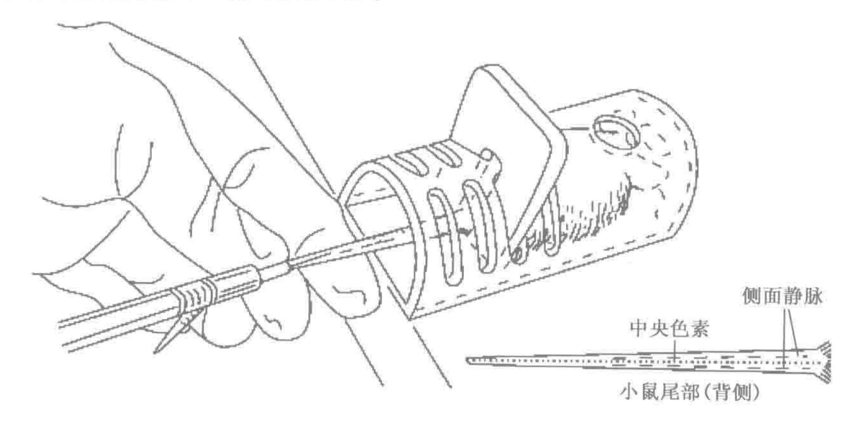


图 A. 2E. 3　小鼠尾静脉注射。

5. 慢慢注射，正确操作的话不会产生气泡；一旦有气泡产生说明操作失误，重新进行操作。
6. 抽出针管，压迫注射位点直到不出血为止。

基本方案 5 小鼠、大鼠和仓鼠的腹膜内注射

材料

小鼠、大鼠、仓鼠
注射剂
1ml 注射器，带 22G～25G 针头

1. 捕捉小鼠、大鼠和仓鼠（附录 2C）。暴露动物腹部，头部向下倾斜。
2. 将注射剂注入针筒，排除气泡。
3. 将针头插入较低的左侧或右侧腹部 1/4 区，不要插入腹部中线（图 A. 2E. 4）。
4. 以适度的压力和速度注射。

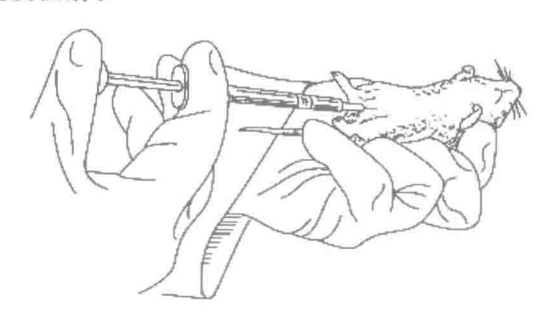


图 A. 2E. 4 小鼠腹膜内注射。

基本方案 6 小鼠足垫注射

这种方法需要两人操作，一人捕捉和固定动物，另一人注射。

材料

小鼠
注射剂
1ml 注射器，带 25G 针头

1. 捕捉小鼠（见附录 2C）。
2. 伸展小鼠后足的脚趾，引针头插入脚底平面的软组织垫。也或者将针头插入第二、三足趾之间的皮下。
3. 注射体积不超过 50μl。拔出针头后垂直压迫止血。

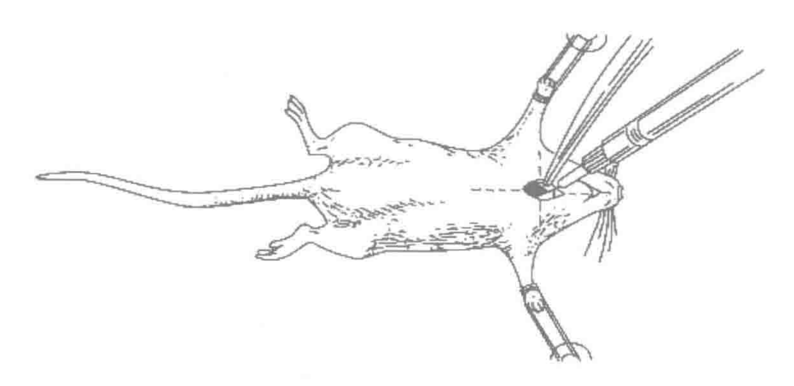
基本方案 7 小鼠胸腺内注射

材料

小鼠

70%乙醇
注射剂
手术台
纱布或药签
3＃解剖刀和15＃刀片
止血钳
直形眼科剪
1ml注射器，带28G～30G针头
伤口夹或4-0缝线和针

1. 麻醉小鼠（附录2D），将其背部向下固定在外科手术台上。
2. 以浸润70%乙醇的纱布或药棉擦洗胸部区域。
3. 以手术刀在胸部做个1cm的中线切口，例如，可选择在下颈部和上胸部之间的区域做切口。
4. 用止血钳和眼科剪纵向切开胸骨上1/3部分，暴露胸腺。
5. 将注射剂注入针筒，排除气泡。将针头插入胸腺软组织，每一叶注射10μl（图A.2E.5）。
6. 拔出针头，缝合伤口。



图A.2E.5　小鼠胸腺内注射。

参考文献：Tuffrey，1987a；Goldschneide *et al.*，1986
撰稿人：John Donovan and Patricia Brown

附录2F　血液收集

本单元介绍了从小型啮齿类动物体内采血的几种方法。具体采取何种方法需依据动物种属、所需血细胞数量、采血频率及是否需要处死动物等情况决定。

注意： 操作必须戴手套。

基本方案 1　小鼠和大鼠的眼眶或眼血管丛取血

材料

　　小鼠或大鼠
　　无菌生理盐水或 PBS（附录 1）
　　微量采血管
　　纱布或药棉

1. 手工捕捉动物（附录 2C），麻醉动物（附录 2D）。
2. 将微量采血管末端置于眼眶中间的眼角（图 A. 2F. 1）。
3. 慢慢的，轴向旋转，将采血管尖向眼窝后部插入，直到有血流入管内。
4. 移开微量采血管，以浸润盐水或 PBS 的纱布或棉球擦拭渗出血液。
5. 观察动物恢复情况。

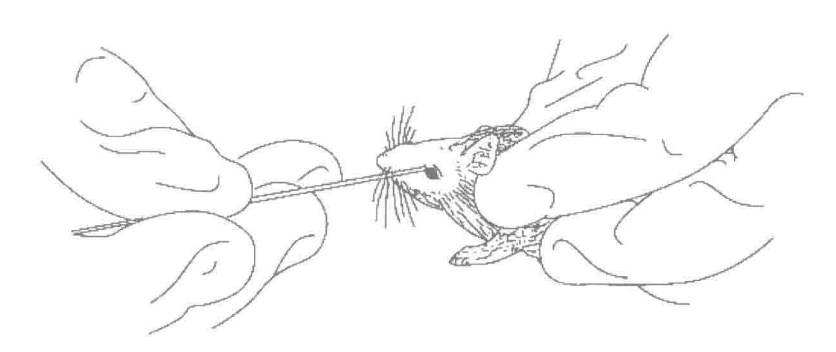


图 A. 2F. 1　小鼠的眼眶和眼血管丛取血。

基本方案 2　小鼠和大鼠的尾静脉微量采血管取血

材料

　　小鼠或大鼠
　　加热灯或含温水的广口杯
　　25G～30G 的针头
　　微量采血管
　　纱布

1. 捕捉动物（附录 2C）
2. 灯照动物尾巴或用温水浸泡尾巴，再以 70％乙醇浸润的纱布或药棉擦洗。
3. 一手拉伸尾巴，另一手将针头向下插入侧面的尾静脉 3～4mm，图 A. 2F. 2。
4. 用微量采血管收集从针头里流出的血。
5. 拔出针头，用纱布压紧，止血。

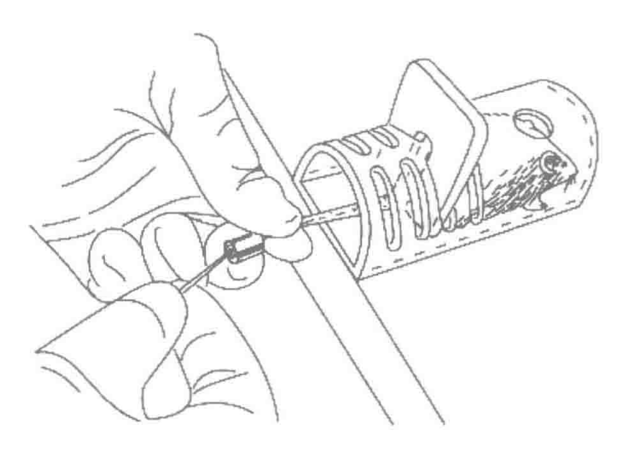


图 A. 2F. 2　小鼠和大鼠尾静脉的微量采血管取血。

备选方案　从小鼠和大鼠的尾静脉以离心管取血

附加材料（其他材料见基本方案 2）

10＃手术刀片

12～50ml 塑料离心管

1. 捕捉动物（附录 2C）。
2. 灯照尾巴或用温水浸泡尾巴，以 70％乙醇浸润的纱布或药棉擦洗。
3. 当拉伸尾巴时，迅速以手术刀割开侧面的尾静脉，将滴下的血置于离心管中。
4. 棉球压迫伤口止血。

基本方案 3　小鼠腋窝丛取血

材料

小鼠

手术台

解剖刀或剃刀

止血钳

手术剪

1. 麻醉小鼠（附录 2D）。将其背部向下固定在手术台上，将脚趾钉住。
2. 以解剖刀或剃刀切开近腋窝的颈部皮肤（图 A. 2F. 3）。
3. 以止血钳从一侧进入扩大创口形成“槽”。用剪刀或刀片分离主要血管丛。
4. 用巴氏吸管和吸球吸取“槽”中涌出的血。
5. 采血完毕颈椎脱臼法处死动物。

参考文献：Tuffery，1987b

撰 稿 人：John Donovan and Patricia Brown

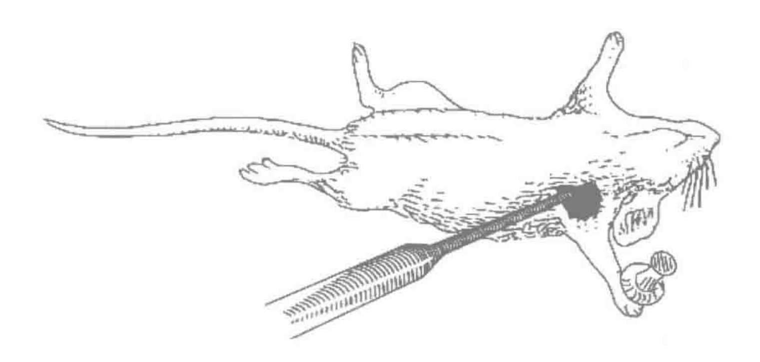


图 A.2F.3 小鼠腋窝丛取血。

附录 2G 安乐死

采用的安乐死方法必须无痛苦、无折磨；操作迅速，易于执行；安全，有效、经济。对动物实施安乐死，必须在无其他动物的环境下进行。此外，安乐死的操作方法不能导致大的理化或组织学变化，以免副作用影响实验结果。

注意：实验动物的安乐死必须由熟练技术人员进行，使用正确的方法，并得到动物保护与使用组织（IACUC）的批准。采用的器材与试剂必须符合人道主义，仅用于科学研究。记住处理动物时必须戴手套。

基本方案 1 二氧化碳窒息

材料

动物
60%～100% CO_2（罐装或干冰）
密闭容器，带活动层和盖子，可以存放干冰或作为 CO_2气室

1. 准备带移动层和盖子的密闭容器，如存放干冰，底部加入温水以使蒸汽迅速充满容器。
2. 将动物放入充满 CO_2的容器，盖上盖子。将动物置于其中一段时间，使其失去清醒，进而死亡。
3. 检查脉搏，观察瞳孔散大情况，验证死亡。

基本方案 2 过量戊巴比妥注射

材料

动物
戊巴比妥盐（60mg/kg）
3ml 针管，带 20G～25G 针头

1. 称重动物，计算其所需剂量，按 60mg/kg 计算。
2. 捕捉动物（附录 2C），腹腔内注射戊巴比妥盐（附录 2D）。
3. 检查脉搏，观察瞳孔散大情况，确证死亡。

备选方案 1　麻醉下放血

附加材料（其他材料见基本方案 2）

铡刀或剪刀

1. 麻醉动物（附录 2D）。
2. 斩首：以铡刀处死大鼠，锋利剪刀处死小鼠，血液会从颈部大血管喷出。
3. 放血：当需要收集干净的终末血时，采取放血方法。放血时用锐利的针垂直插入心脏取血；或者暴露腹部，在腹部剪开一个中线切口，将腹部脏器向一侧推开，可以看见腹部大动脉或静脉窦（靠近背侧腹膜腔），用针头和针管从中大量采血。

备选方案 2　小鼠颈椎脱臼

一些研究人员认为这种方法更加适当，因为操作迅速并且没有化学污染。

材料

小鼠

铅笔或金属小棒

1. 抓住尾巴，将小鼠从笼中取出，将其置于光滑、坚硬的平面上，记住不要放开尾巴。
2. 将铅笔或金属小棒紧紧压住耳后的颈部。
3. 猛拉尾巴后部，向下压颈部（迅速断裂颈椎）。

参考文献：Andrews，1993

撰 稿 人：John Donovan and Patricia Brown

附录 2H　淋巴器官和胸腺的摘除

在大多数实验中，淋巴组织都是从新杀死动物身上分离得到，但有时也需要在麻醉下进行外科手术，从活体动物体内摘除器官：胸腺和脾脏，并继而观察动物恢复情况。从新生和成年动物体内摘除胸腺对 T 细胞发生和发育具有显著影响，此方法也是研究 T 细胞发生、耐受和发育的重要方法。

基本方案 1　小鼠淋巴器官的摘除

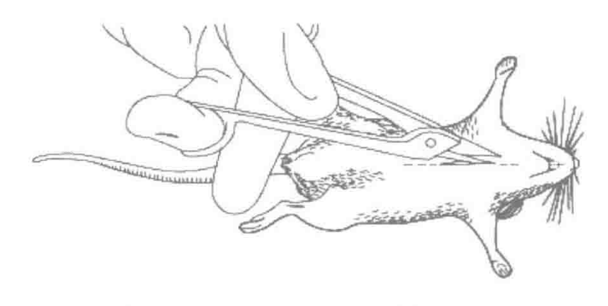
本方法包括分离和摘除小鼠的淋巴气管，但是同样的方法对于其他啮齿类动物，手术方法需要一些细小的改动。

材料（带√项目见附录 1）

小鼠

70%乙醇
HBSS或组织培养基
眼科剪（直形或弯曲）
眼科镊（弯曲）
组织培养皿

1. 人道方式处死动物（附录2G）。将动物背部向下，平放在干燥、清洁、具有吸收性的纸上。
2. 70%乙醇消毒手术区域，避免污染。
3. 以眼科剪沿中线剪开切口（图A.2H.1），用剪刀和戴手套的手指分开头部以上和大腿以下的皮肤。
4. 调整动物体位，暴露左侧的脾（步骤5～8），淋巴结（步骤9～11）；摘除胸腺则不需要改变体位（步骤12～14）。
5. 外科剪在左侧腹膜剪开1in大小的口子。
6. 用弯曲的眼科镊尽可能多地夹住脾脏。
7. 温和地将脾脏（通过结缔组织与胃大弯连接）和周围腹膜分开，撕开脾脏后的结缔组织。两种选择：一点点地撕开脾脏顶部和底部的腹膜；但实际上，尤其在有大量动物要处理时，迅速撕开结缔组织能更有效迅速地分离脾脏。
8. 将脾脏置于盛有几毫升的HBSS或组织培养基的培养皿中。



图A.2H.1 中线切口摘除淋巴组织。

9. 按图A.2H.2的方法鉴别淋巴组织。

   通常，未经免疫的动物体内环境清洁，所以淋巴结很小而难以被发现。在剪开的区域上方易发现腋窝淋巴结，偶尔在临近的三头肌区域也能找到臂状淋巴结。颈部淋巴结则与气管持平，位于唾液腺下方。腹股沟的淋巴结位于连接皮肤的脂肪垫上；但在分开皮肤后，常发现腹股沟淋巴结包埋在脂肪内，有时甚至接近膝盖。肠系膜淋巴结位于小肠肠系膜深处。颈部和肠系膜淋巴结经常容易被忽略。通常，从一只小鼠体内可以分离出1×10^7～5×10^7个淋巴结细胞。

10. 弯钳夹住淋巴结，将其从组织中分离，必要时切开脂肪。
11. 将淋巴结置于盛有数毫升的HBSS或组织培养基的培养皿中。
12. 用外科剪做胸部切口，从剑状软骨一直延伸到颈部。必要时用弯钳分开肋骨。
13. 弯钳夹住胸腺（器官黄白相间，在身体中线上紧挨于肋骨下，接心脏上部）的一片圆形突起，温柔分开胸腺。

因为胸腺是纤细的器官，所以摘除时不能用常规方法撕裂。除非需要采集大量细胞，否则不能采用有害的分离方法。胸腺大小随年龄变化而差别很大，在3～5周时体积最大，后逐渐萎缩，减小到约6个月大时的体积。分离得到的胸腺细胞数量与动物年龄和胸腺大小相关。

14. 将胸腺置于盛有几毫升的HBSS或组织培养基的培养皿中。

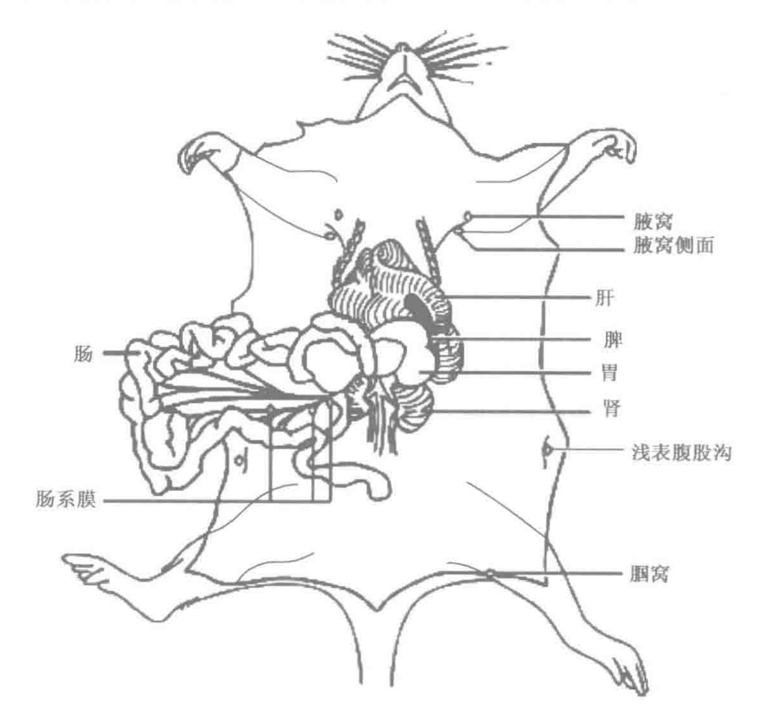


图 A.2H.2　小鼠体内淋巴结和脾脏分布图。

基本方案2　脾切除术

材料

3周龄以上的小鼠
1mg/ml戊巴比妥
70％乙醇
眼科剪（直形或弯曲）
眼科镊（10cm长，带弯曲末端）
4-0缝线
灭菌的10cm×10cm纱布垫

1. 手术前10～15min腹腔内注射麻醉动物（附录2D）。剂量使用见表A.2D.1，初始剂量40mg/kg。观察动物的麻醉反应，如慢速呼吸，对挤压足部无反应等。如果没有这些现象发生，则需要注入更多的麻醉剂或吸入麻醉剂，按150mg/kg补足剂量。
2. 70％乙醇消毒皮毛，避免皮毛进入腹腔。

3. 动物取右侧卧位。剪刀在左侧后肢与臀部中间部位切开一个约 2.5cm 长的切口（图 A.2H.3A）。用止血钳的钝末端分开皮肤下的结缔组织。

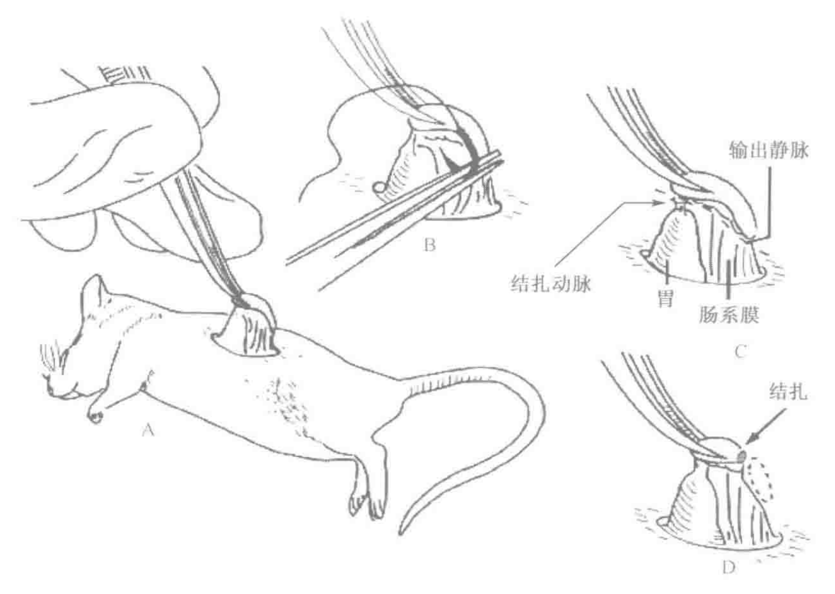


图 A.2H.3 脾脏切除术。皮肤上切开小切口，分开腹部皮肤、肌肉、腹膜，暴露脾脏，结扎脾动脉，取出脾脏。

4. 在腹膜上切开 1～2cm 的切口，温柔的分离脾脏（通过肠系膜与胃大弯紧密连接），将其置于腹膜外。
5. 寻找到小动脉（与脾相连，紧挨着胃）。穿过肠系膜以 4-0 缝线和针结扎动脉，在脾脏顶部打一个单结。如果手术中发生大量出血，则结扎脾脏另一端的输出静脉。
6. 切开肠系膜和结缔组织，摘除脾脏。
7. 用一或两根缝线缝合腹膜，再用 2 或 3 根线缝合皮肤，剪掉线头。缝合必须紧密，避免松弛。
8. 以灭菌的纱布垫擦掉皮肤上的血迹，将动物放在距加热灯 15～22cm 处。让动物休息，直到麻醉消失（30～60min），期间保持气道通畅。
9. 待动物能够自主翻身后，将其放回清洁的笼具中。注意在一个笼具中不要放置超过 5 个处于恢复期的动物。

   起初动物会自己舔拭切口，撕咬缝线。

备选方案 脾半切除术

1. 遵循基本操作 2 的实验步骤 1～4。
2. 将缝线穿越脾脏中部，打结，保持脾门完整可以最大限度减少出血。分离脾脏时，柔和地拉紧缝线结扎，尤其在术前出现中等脾疝时更要注意动作轻柔。
3. 剪刀切除下部脾脏，将其取出。
4. 缝合参照基本方案 2 的步骤 7～9。

基本方案 3 新生鼠胸腺摘除

新生鼠胸腺摘除术常用于在无需取出 T 细胞前体情况下，去除鼠的成熟 T 细胞实验。出生 3d 后的小鼠即可行此手术。出生 3d 后的小鼠行胸腺摘除术，不会改变胸腺对于 T 细胞依赖抗体和细胞免疫反应的影响。

材料

小鼠（3d 内出生）
生理盐水或 PBS（附录 1）
灭菌的 5cm×5cm 纱布垫
台用白炽灯
解剖台（木制或聚苯乙烯）
解剖显微镜
眼科剪（垂直；Roboz＃RS-5650，-5658 或相当的号型）
无齿钳（尖端弯曲；Roboz＃RS-5045，-5047，-5057 或相当的号型）
套管（见辅助方案）
止血钳或止血夹
6-0 缝线和针
浸润生理盐水或 PBS 的棉条
柔软的火棉胶（U. S. P）
60mm 或 100mm 消毒培养皿

1. 术前将新生鼠与母鼠分开。在手术时，避免噪声；否则会激怒母鼠，当送还新生鼠时会攻击实验人员。
2. 将新生鼠放在清洁的纱布上，距离白炽灯 10～15cm。将新生鼠放在一个冰块垒积的洞中（直径 2.5cm，深 5～8cm）3～4min，直到肢体停止运动为止。

   新生鼠脚趾会变得苍白。长时间暴露在冰上，会导致全部肢体苍白坏死，严重时会导致死亡。将小鼠从冰上取下，立刻进行麻醉，可能增加小鼠死亡率。

3. 将新生鼠从冰上取出，置于解剖台上两条平行橡胶带之间，将前后肢固定在橡胶带下（图 A. 2H. 4A）。
4. 解剖显微镜下，用剪刀在二、三肋骨间剪开一个小切口，向锁骨处延伸切口。在胸骨和肋骨之间，用剪刀在右侧第二或三肋骨之间尽可能小地刺穿胸腔。
5. 向锁骨方向在肋骨和胸骨之间尽可能浅地延伸切口，在锁骨于右侧胸骨柄边缘切开。
6. 用弯钳温和分离肋骨，就在肋骨下、心脏顶部近头侧可见黄白相间的胸腺顶部。
7. 浸润生理盐水或 PBS 的套管尖端固定在胸腺处，与头成锐角（图 A. 2H. 4B）。剪下胸腺将其取出。剪下胸腺时要仔细小心，以免损伤心脏和肺泡。少量出血用棉条处理。检查胸腺是否清理完全。暴露时间不宜过长，这对动物存活具有重要影响。

   如果麻醉适当，手术时只会有少量出血。一旦发生大量出血，动物很可能死亡。

8. 止血钳止血，用一根缝线将肋骨和胸骨缝合在一起。无需用额外的缝线。
9. 用盐或 PBS 浸泡的棉纱布擦去血液。一滴火棉胶封闭切口，晾干。将动物放置于消

毒培养皿中，距离白炽灯 15～20cm。因为新生鼠消耗热量过多，所以不要使用红外灯。

必须逐步加温，否则会引起休克。

10. 待新生鼠肢体运动正常、呼吸正常、肤色恢复粉红时将其放回母鼠身边。将新生鼠放入笼具的角落，轻轻敷上垫料。

室内恢复安静时母鼠很快会寻找幼鼠，母鼠会在自己的角落或别的角落铺设新鲜的巢，它会用嘴将新生鼠叼回（也可能攻击新生鼠）。在断奶期前都不要对术后的新生鼠使用耳夹和趾夹，以免招致母鼠攻击。

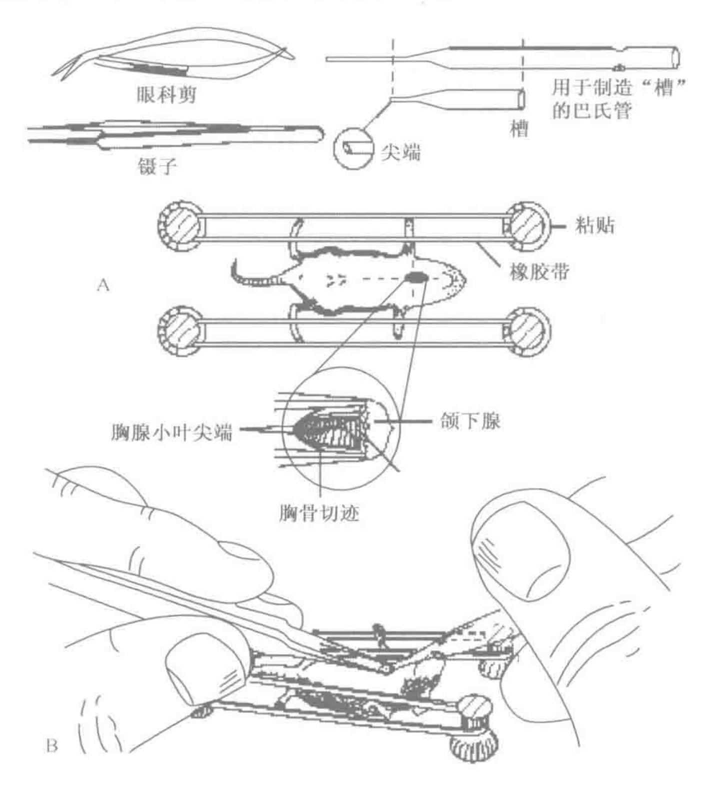


图 A.2H.4 新生鼠胸腺摘除术。A. 麻醉后新生鼠的体位，用橡胶带固定麻醉的新生鼠，胸部切口下暴露胸腺和周围结构（放大图）。B. 新生鼠摘除手术示意图。

基本方案 4 成年鼠的胸腺摘除术

摘除成年鼠的胸腺可以造成免疫系统处于限制状态：没有新的 T 细胞产生；T 细胞数量恒定，易于进行研究和实验。年轻和成年大鼠的胸腺摘除术已在单元 10.7 做了介绍。

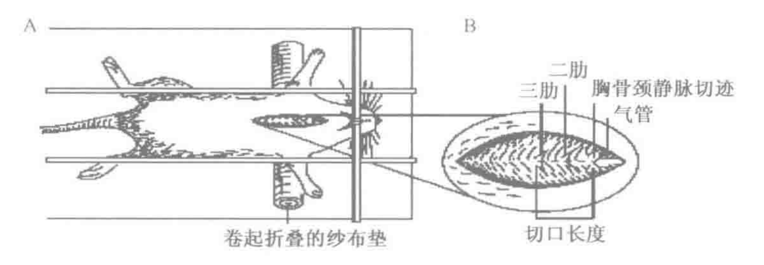
材料

大于 3 周的小鼠

70%乙醇
解剖台（7cm×10cm）
弹性带
眼科剪（10cm，直）
眼科镊（2对10cm长，半弯曲）
灭菌5cm×5cm纱布垫
吸入套管（见辅助方案）
6mm直径橡胶管
Adams自动夹，9mm伤口夹
台用白炽灯

注意：无论采取何种方法摘除胸腺，实际操作时间应尽量比所需总时间缩减1min，以免肺泡塌陷。

1. 将剪刀和钳子放在盛有70%乙醇的大口杯中。
2. 腹腔内注射麻醉动物，诱导充分麻醉效果。
3. 将鼠背部向下放在解剖台上，头侧朝向操作者。如图A.2H.5所示，将卷成条状的纱布垫在鼠的肩部下，以使心脏和胸腺向前突出。用两根平行的弹性带将肢体固定住。将第三根带放入鼠口中，向后压迫头部以使颈部充分伸展。
4. 70%乙醇消毒颈部和上胸部。在胸骨凹槽用剪刀沿中线纵向切开皮肤。向下延伸2～3cm。用钳的钝端分开皮肤和下方肌肉。暴露胸腺区域。



图A.2H.5　成年鼠胸腺摘除术。A. 弹性带将小鼠固定在解剖台上的体位。B. 定位胸骨凹槽，从胸骨凹槽到二、三肋骨间的中线切口。

5. 用另一只手固定胸骨凹槽，在胸骨下插入剪刀，切到第二或第三肋骨。某些小鼠在中线上很难区分胸骨和胸腺。此时，应先小心地分开唾液下腺，找到气管。气管就是剪刀插入胸腔的中线标志。第二肋骨易于鉴别，其位于胸骨凹槽上方连接胸骨，形成第一个显著的“V”。
6. 90°翻转小鼠使其面向操作者。拿钳的手近头部（头钳），另一只手近尾部（尾钳）。
7. 将尾钳插入切口，用钳的弹力暴露胸腔，保持胸腔开放。
8. 头钳分离带状肌（常遮盖住胸腺），温柔地分离肌肉，不要合上钳；撑开尾钳，使条状肌和胸腔都保持开放。

胸腺分页就像两片薄盘覆盖在心脏上方。在以下情况下分离条状肌：条状肌紧贴第二肋骨，所以此时分离胸腔切口往往必须移开条状肌。

解剖法

9a. 观察胸腺，胸腺位于心室上部，覆盖在心脏大动脉和静脉上。用头钳温柔夹住胸腺圆锥，向头部方向举起。

10a. 缓缓将胸腺拉出胸腔：用撑开胸腔的尾钳夹住胸腺下缘（遮盖胸腺的胸廓会部分关闭）；移动头钳，翻转使夹住的胸腺面向操作者。稍向下移动尾钳，夹住胸腺下部，提起胸腺。翻转尾钳，使夹住的胸腺面向操作者。以头钳继续向下移动，分离。用双钳夹住胸腺，进一步向上举起胸腺，如此重复操作，逐渐向下分离，直至胸腺脱离胸廓。慢慢左右翻转双钳，将胸腺完全移出。

当胸腺双叶都被取出胸廓，胸腺就成功移出，此时只有很少的中间连接组织残留在体内。

11a. 一只钳固定在胸腺下，暴露薄的结缔组织。另一只钳夹住这些结缔组织，将其与胸腺双叶分离，也可以逐叶分离胸腺上的结缔组织（当切口偏离中线时）。进行步骤12操作。

本步骤至关重要，因为这些结缔组织与大血管相连，粗暴操作会造成严重损伤。

吸引法

9b. 参照辅助方案准备套管，插入套管，将尖端放置于胸腺一叶的下端，以使套管打开时胸腺小叶可以完全闭塞。

10b. 参照辅助方案，用嘴吸套管或使用真空泵，须根据胸腺叶片栓塞进程控制吸入速度。同时将小叶向头部方向举起，以偏离心脏，注意温和操作。

11b. 在另一叶重复操作。

12. 观察胸腺，双叶会逐渐压紧。检查胸腔和胸腺，以免有部分胸腺组织遗漏。

通常因为心脏运动和胸膜上的弹性绳松开，会导致残留胸腺会落入心脏和肺之间。不要盲目地寻找残余的胸腺（如在没有清晰视野的情况下）；若盲目操作，往往会损害重要脏器。

13. 移去双钳，缝合胸廓。松开肢体，用1～2个9mm伤口夹保护皮肤。

14. 用盐或PBS浸泡的棉纱布擦去血液。白炽灯温暖小鼠。60min内，观察是否出现以下良好的术后恢复体征：规律而较快的呼吸，粉红色的皮肤和舌头，切口处无渗血。如缝合胸腔后，仍没有自主呼吸，就从鼻或口中插入小管时小鼠恢复自主呼吸，促其苏醒。

辅助方案 胸腺吸入套管的制备

通常，吸入套管由（玻璃）巴氏吸管或一次性的塑料吸管制成。不论采取何种胸腺摘除术，新生鼠的胸腺摘除都必须采用玻璃套管，因为其尖锐的底端易于插入新生鼠胸腔。

1. 从一个5.25in（约13cm）的巴氏吸管锥体上部上切除最少6cm的尖端用于新生鼠；或使用10ml的吸管用于成年小鼠。丢弃其余部分，用火封闭吸管末端。

2a. 对新生鼠：待火烧部位逐渐冷却后，用火加热其他部位，将其吹制成内径约 1mm 的小套管，其体积足以封闭胸腺小叶。

2b. 对成年鼠：待火烧部位逐渐冷却后，切下约 5cm 的末端，形成直径约 4mm 的套管，稍大于成年小鼠胸腺小叶。用砂纸将锋利末端打磨光滑。

3. 为便于吸入操作，在套管上再钻一个约 6mm 的孔。将套管粗端套上塑料管、真空瓶或真空泵。为方便控制，可以用嘴吸（但对新生鼠不适宜）。操作时，为防止意外情况下吸出胸腺，可使用一根相对长的管（>0.6m 或 2ft）来吸取。以口吸取时，如需要，还需准备一个包含 15ml 塑料离心管的小袋，一个双孔的塑料夹，两个玻璃或塑料管，作为预备。

参考文献：Sjokin *et al*.,1963；Van Alten，1984

撰稿人：J. P. Reeves P. A. Reeves，and L. Thomas Chin（成年小鼠胸腺摘除术）

［张意（附录 2）］

附录3　免疫学常用细胞实验技术

附录3A　细胞生长的检测

基本方案1　血细胞计数板计数细胞

血细胞计数板是一种划分为几个特定区域的特殊载玻片，每个区域充盈特定体积的细胞悬液，用适当的方法计算这一特定体积内的细胞数就能够确定每毫升细胞悬液的细胞数。

用血细胞计数板只能计数细胞，若同时加用台盼蓝拒染实验（附录3C）则能够区分活细胞和死细胞，且后者可避免因细胞成团或大小不一而产生的误差。

材料

待计数的细胞样品

带盖玻片的血细胞计数板

注：计数的细胞过少时会出现显著的误差，最好应计数300个细胞。

1. 在一块洁净的细胞计数板上盖上一块洁净的盖玻片。
2. 将一根无菌的0.1ml或1ml的吸管浸入均匀混悬的细胞悬液中，使吸管的末端形成一滴小液滴，轻轻地靠盖玻片边缘滴在的细胞计数板上。
3. 将细胞计数板放在光学显微镜上，调焦对准细胞。
4. 计数四角上的$1mm^2$小方格中（$0.1mm^3$体积）的细胞，包括左边线和下边线上的细胞，不包括上边线和右边线上的细胞。小团块细胞计数为单个细胞。如果有大的细胞团块，应在计数前尽量吹散细胞。如果不能吹散团块，则每个细胞团块计数为一个细胞。
5. 每毫升细胞悬液中细胞数计算如下：

   每$0.1mm^3$体积平均细胞数＝四个小方格中细胞总数/4

   每毫升细胞总数（细胞数/cm^3）＝每$0.1mm^3$体积平均细胞数$\times 10^4$

基本方案2　库尔特粒度仪计数细胞

另一种方法是用库尔特粒度仪（一种电子微粒计数仪）计数细胞。该仪器的基本原理在于微粒（悬于电解液中的细胞）通过一个有电流的微孔时改变电解液的电阻，从而改变电流和电压。改变的大小与微粒的大小呈正比，并能够转换为微粒数。

该仪器每秒钟能够检测500个微粒并计算出大小。微粒大小的计算与微粒在液体中的形状或方位无关。大多数仪器都有一个最小阈值设置，这样可以根据颗粒的大小排除体积太小的微粒。该仪器可以利用侧向散射区分活细胞和死细胞。有关仪器的详细操作

可见生产商提供的说明书。

撰 稿 人：Warren Strober

附录 3B　细胞冻存

因细胞长期在体外培养可能导致表型和基因型的改变，故需进行细胞体外培养的实验室应能够冻存和复苏细胞，以维持细胞的稳定性。

基本方案 1　细胞株或杂交瘤的冻存

细胞株在－70℃能够稳定保存数周，数月以后复苏细胞活力会逐渐降低（一般 6 个月后细胞不能成功复苏）。而细胞株在液氮中则能够永久稳定保存。谨慎冻存细胞株非常重要。

材料

待冻存的细胞株
冻存液
无菌的 75cm^{2}细胞培养皿
无菌冻存管
记号笔（不溶于水和乙醇并耐冻）
无菌 50ml 锥底离心管
Beckman 离心机
冻存盒

1. 处于对数生长期的待冻存细胞，可培养于 75cm^{2}细胞培养瓶。
2. 用记号笔在无菌的冻存管上标记细胞株名称、培养基和冻存日期，或者只标记数字编号，然后在记录本上记录该编号细胞的详细资料。
3. 用无菌的 25ml 吸管将细胞转移到无菌的 50ml 锥底离心管中。如果是贴壁细胞，则在转移前先用细胞刮或胰酶将细胞消化下来。
4. 收集的细胞室温，500*g* 离心 5min，弃上清，取细胞沉淀。
5. 将预先配好的冻存液加入到细胞沉淀中，使细胞终浓度达到 2×10^6 个细胞/ml（将 75cm^{2}细胞培养瓶中的细胞冻到一个冻存管），或可达 10^7 个细胞/ml，轻轻地重悬细胞。
6. 每个冻存管加 1ml 细胞悬液，拧紧盖子，将细胞迅速放入“程序降温盒”并置于－70℃冰箱。
7. 如果短期保存，则可将细胞保存于－70℃冰箱。如需长期保存则应尽快将细胞转入液氮罐保存。
8. 将冻存的细胞株名称和冻存日期详细地记录在记录本上。

基本方案 2　细胞株或杂交瘤细胞的复苏

将待复苏细胞置 37℃水浴中迅速融化。细胞培养应使用与冻存前相同的培养基。

如果细胞株是细胞因子依赖的还应加入相应的细胞因子，特别是对于转染的细胞，需使用选择性培养基。大部分杂交瘤细胞不需要用具有次黄嘌呤/氨基蝶呤/胸苷嘧啶（HAT）的培养基重新筛选（单元1.3）。抗原特异性细胞株（如T细胞克隆）在复苏时应重新刺激。

材料

冻存的细胞（见基本方案1）
70%乙醇
用于细胞培养的培养基
干冰
12ml带盖无菌离心管
Beckman离心机
细胞培养瓶

1. 将待复苏的细胞从冻存处（−70℃或液氮罐）取出，放置在干冰上以减少融化。
2. 将冻存管底部一半放入37℃水浴中进行融化（不要完全浸在水中），轻轻晃动，直至完全融化。
3. 在超净台中用70%乙醇擦拭冻存管壁，轻轻打开冻存管，用无菌的1ml吸管轻悬细胞，然后将其转移到12ml离心管中。
4. 加9ml的培养基，一次1或2滴，边加边晃动，盖好盖，室温，500*g*离心5min。弃上清，并按所需密度重悬细胞，转移到细胞培养瓶或其他的培养容器中。
5. 用倒置显微镜观察细胞形态，台盼蓝拒染实验检测细胞的活力（附录3C）后，准备细胞培养。

参考文献：Areman *et al.*，1998
撰 稿 人：Wayne M. Yokoyama

附录3C　台盼蓝拒染试验检测细胞活力

基本方案

染料拒染是一种简单而快速的检测细胞活力的技术，活细胞具有完整的包膜因而拒染，而死细胞却不能。不过此方法也存在问题：由于活力检测由细胞膜的完整性来间接的决定，因此，即使细胞膜是完整的，细胞活力也可能很弱（通过其生长能力或功能检测来反映）。相反，细胞膜不完整时，细胞可能通过自我修复而具有活力。另外一个潜在的问题是由于观察染料的摄取是通过主观判断，少量染料的摄取容易被忽略。在这方面，通过普通光学显微镜检测台盼蓝拒染与荧光显微镜检测荧光染料拒染的比较，发现荧光法能够检测到更多的没有活力的细胞。

更为精确的检测细胞活力的方法是通过细胞对光的散射能力和对碘化丙啶的摄取（单元4.2）。然而这一方法较繁琐，只有在需要检测细胞混合物中死细胞的数目时才有必要。

材料（带√项目见附录1）

√PBS或无血清的完全培养基

0.4%（*m*/*V*）台盼蓝（避光保存，长期保存后需过滤，GIBCO/BRL）

1. 取一定量方便计数的细胞悬液（如5×10^5个细胞/ml），将细胞重悬于1ml PBS，用0.4%台盼蓝稀释，100*g*离心5min，弃上清。（**译者注：**该步骤可不用台盼蓝稀释）
2. 用1ml PBS或无血清完全培养基重悬细胞（血清会染台盼蓝）。1份0.4%台盼蓝与1份细胞悬液混合，在室温条件下孵育3min。
3. 在3～5min内，滴一滴台盼蓝/细胞混合液于细胞计数板上（附录3A）。将计数板置于显微镜台上并聚焦。分别计数未着色（活细胞）和着色细胞（死细胞）。
4. 活细胞数乘以2（台盼蓝的稀释倍数）即得到活细胞总数。将总的活细胞数和死细胞数相加然后乘以2即得到样品中细胞总数。按照下面公式计算活细胞的百分率：

$$\text{活细胞百分率（\%）}=\frac{\text{活细胞数/ml 样品}}{\text{细胞总数/ml 样品}}\times100$$

参考文献：Shapiro，1988

撰 稿 人：Warren Strober

附录3D　瑞氏-吉姆萨和非特异性酯酶染色

基本方案1　瑞氏-吉姆萨染色通常用于淋巴细胞形态的研究

材料（带√项目见附录1）

100%乙醇

瑞氏染液（Columbia Diagnostic）

√工作缓冲液

√吉姆萨工作染液

1. 将待染色的细胞涂于载玻片上，风干。

2a. 如待染色载玻片大于3：将染色的载玻片依次浸入以下液体中。如果染色样本为人骨髓，由于该样本富含脂肪，需延长作用时间并重复染色。

100%乙醇	1～2min
瑞氏染液	4min
工作缓冲液	4min
吉姆萨工作染液	4min
双蒸水	

2b. 如果待染色载玻片≤3：用巴斯德管依次滴加上述染色液至载玻片上，作用相应时间后，翻转载玻片用吸水纸吸掉剩余溶液。

3. 风干玻片。

4. 根据下表在显微镜下判断细胞的类型。

细胞类型	颜色
红细胞	淡粉红
白细胞	红紫色
嗜中性粒细胞	淡粉红至紫丁香
嗜酸性粒细胞	鲜红至橙
嗜碱性粒细胞	暗红色、紫色
血小板	暗紫丁香
单核细胞	板灰色（细胞质）和略带粉红颗粒

基本方案 2　非特异性酯酶染色

本染色反应可鉴定单核/巨噬细胞。非特异性酯酶染色阳性结果胞质中出现红棕色颗粒，苏木精染色细胞核呈紫罗蓝色。

材料（带√项目见附录 1）

√预冷的甲醛-丙酮固定液
√磷酸盐缓冲液/六氮化碱性副品红/α-丁酸萘
苏木精

1. 将待染色细胞涂于载玻片上，空气风干。
2. 将细胞涂片放在预冷的甲醛-丙酮固定液中固定 30s。
3. 室温空气风干 10～30min。
4. 将固定的细胞在 40.2ml 的磷酸盐缓冲液/六氮化碱性副品红/α-丁酸萘中室温作用 45min。
5. 用双蒸水冲洗载玻片，在显微镜下观察湿的载玻片，如果核依然是红色的，多漂洗几秒钟；若核染色被洗掉，用苏木精复染，并减少洗涤。
6. 将载玻片浸入苏木精，复染 5～10min。
7. 用自来水漂洗 15～30s，室温风干。
8. 显微镜下检查染色后的涂片；或者用合适的封固剂来封固涂片（如 Permount）。

参考文献：Li *et al.*,1973；Marshall *et al.*,1975；Wittekind，1979
撰 稿 人：Warren Strober

附录 3E　^{3}H TdR 的掺入

基本方案

材料

1mCi/ml ^{3}H TdR（6.7Ci/mmol，Du Pont NEN 或 ICN Biomedicals）

无血清的 RPMI 完全培养基
含有培养 1～7d 细胞的微孔板
取样用微量吸管（Brinkmann）
0.5ml 分液管，无菌
半自动样品收集器

1. 于 95ml RPMI 完全培养基中加入 5ml 1mCi/ml ^{3}H TdR，使终浓度为 50μCi/ml，每孔 20μl（1μCi）加入到微孔板中。
2. 将微孔板放回到 37℃，5% CO_2 的孵箱继续培养 4～24h（培养时间根据实验来确定，推荐使用 18～24h）。
3. 用半自动细胞收集器收集样品，根据生产商推荐的操作程序用 β 液闪仪检测，数据分析和处理建议参照单元 2.11。

撰 稿 人：Ethan M. Shevach

附录 3F　判断并处理细胞培养中的支原体污染

支原体污染经常被忽略是个潜在的严重问题，下述状况可能意味着支原体的污染：

1. 曾经生长旺盛的细胞株生长缓慢。
2. 贴壁细胞不贴壁。
3. 细胞株不能生长到较高密度（>1×10^6 个细胞/ml）。
4. 采用细胞融合技术不能形成 B 或 T 细胞杂交瘤。
5. 细胞不能通过有限稀释法形成克隆。
6. 细胞培养上清中可见大量的细胞碎片。

支原体污染还会影响细胞的生物学功能，下述功能性实验结果可能标志着支原体污染：

1. 单克隆抗体或培养上清对任何增殖检测的抑制效应。
2. 细胞上清对 B 细胞增殖的协同刺激效应。
3. 细胞株掺入比预期高的 ^{3}H TdR。
4. T 细胞克隆或 T 细胞杂交瘤不能正常增殖或分泌细胞因子。

基本方案 1　检测可能存在的支原体污染

本方法除了用于常规检测培养细胞支原体污染外，还可以用于估计条件培养基可能存在的支原体污染。值得注意的是，每个细胞株应每两个月检测一次支原体污染。

材料

SP2/0-Ag14 杂交瘤（ATCC # CRL 1581）
不含抗生素培养基中的被检细胞
MycoTect（Life Technologies）包含 6-甲基嘌呤脱氧核苷（6-MPDR），6-甲基嘌呤（6-MP，Sigma）

96孔平底板（Costar Falcon）

1. 在96孔平底板中，加入50μl含有2×10^3 SP2/0-Ag14（4×10^4个细胞/ml）的细胞悬液，设3复孔。该细胞通常比GIBCO/BRL推荐的3T6细胞更为方便。
2. 用无抗生素培养基培养被检细胞，置37℃，5% CO_2的细胞培养箱培养≥24h使细胞过度生长，收集培养上清，然后在步骤1中铺好的SP2/0-Ag14细胞中，每孔加入50μl培养上清。
3. 在第1个孔中（阴性对照）加入100μl培养基，第2个孔中加100μl的6-MPDR（终浓度为40μmol/L），第3孔加100μl的6-MP（终浓度6μmol/L）作为阳性对照。根据操作手册推荐用Mycotect试剂盒中腺苷磷酸酶作为另一阳性对照。在37℃，5% CO_2的孵箱中孵育2～3d。
4. 在倒置显微镜下观察SP2/0-Ag14生长状况（通常无需结晶紫染色）。如果没有支原体存在，细胞会在培养基和6-MPDR条件下生长，不会在6-MP存在的情况下生长；如果有支原体存在，细胞会在培养基条件下生长，但不会在6-MPDR和6-MP存在的培养基中生长。

基本方案2 用BM-cyclin处理污染的细胞

这里给出了用四环素与截短侧耳素的复合物（BM-cyclin）和环丙沙星（ciprofloxacin）（见备选方案）挽救支原体污染细胞的方法。BM-cyclin较环丙沙星法更为复杂，且BM-cyclin对细胞有更多潜在的毒性。然而，BM-cyclin法较环丙沙星法较成熟，因此，在此选择BM-cyclin方法简介。

处理成功的细胞应该生长旺盛，且没有支原体污染的表征。

材料（带√项目见附录1）

√无菌的BM-cyclin溶液1和2

污染的细胞（见基本方案1）

1. 用BM-cyclin溶液1和2分别做标准曲线，来确定污染细胞对BM-cyclin溶液的最大的耐受剂量。准备一系列不同浓度的BM-cyclin溶液，起始浓度为每10ml培养基加入20μl的BM-cyclin溶液，然后梯度系列稀释（如用10μl/10ml、5μl/10ml、2.5μl/10ml）。适当密度的细胞株用BM-cyclin溶液1在37℃，5% CO_2的孵箱培养3d，然后在BM-cyclin溶液2中培养4d。
2. 用倒置显微镜观察培养细胞或用台盼蓝拒染试验（附录3C）来确定BM-cyclin溶液不杀死细胞的剂量。
3. 用最大耐受剂量的BM-cyclin溶液1将细胞置37℃，5% CO_2的培养箱培养3d，然后，换用同样剂量的BM-cyclin溶液2继续培养4d（以上为一个循环）。细胞生长达到平台期后，用加有相应最大耐受剂量的新鲜BM-cyclin溶液的培养基传代。
4. 取部分已经处理完毕后的细胞冻存（附录3B），其余细胞继续以下的处理。
5. 重复步骤3～4两次。每个循环之后，用倒置显微镜或台盼蓝拒染来确证细胞的生长活力和状态是否得到改善（通常需要3个循环）。根据细胞的生长速度和密度要求将细胞传代。如果还需一个循环的话，用大于其根除剂量处理细胞一个循环。但需注

意抗生素处理应小于 4 周，因为可能会形成耐受微生物。如果单克隆抗体生成的杂交瘤通过长时间的处理丧失了分泌抗体的能力，在处理过程中可通过有限稀释法（单元 1.3）让其重新形成克隆。

6. 检测细胞株支原体污染情况（见基本方案 1）。在没有 BM-cyclin 的情况下培养细胞并检测支原体的复发。

备选方案 用环丙沙星处理支原体污染的细胞

加 10mg/ml 盐酸环丙沙星（附录 1）至污染的细胞株使其终浓度为 10μg/ml（1：1000 稀释），置 37℃，5% CO_2的孵箱培养 12d，冻存、检测并培养细胞（见基本方案 2，步骤 4～6）。

参考文献：McGarrity *et al*.,1979

撰 稿 人：Frank W. Fitch，Thomas F. Gajewski，and Wayne M. Yokoyama（抗生素处理）

附录 3G 人外周血单个核细胞的分离

外周血是单个核细胞的主要来源，当需要血量相对少时（10～100ml），可通过简单的静脉穿刺得到，若需要量较大时（300～5000ml），则需采用淋巴细胞去除法获得。

注意：当操作人血、细胞或有感染因素的试剂时，应当按生物安全规范操作。

基本方案 静脉穿刺采集外周血

材料

不含防腐剂的肝素（备选）
真空注射器（20G 或 21G）和持针钳或类似器械，或者 17G～21G 和 23G 针头
抗凝管（如含有肝素）
干的、经碘酒和 70%乙醇浸泡过的无菌纱布
止血带和绷带

1. 将进针处的区域消毒（建议在肘窝，因为这一位置的静脉血管较粗大且表浅，易于固定），用碘酒浸泡过的纱布用力擦洗，然后再用乙醇浸泡的纱布清洗。

2a. 传统的真空收集法：根据操作手册，组装针头、持针钳、抗凝管等。

2b. 注射器收集法：用 21G 或 23G 针头吸取无防腐剂的肝素。吸取足够量的肝素以保证其终浓度约 5U/ml（收集了全血样品之后）。拿掉针头换一个相应规格的针头来采血。

2c. 小儿头皮静脉蝴蝶针介导的收集法：将小儿头皮静脉蝴蝶针通过有弹性的塑料管与真空血液收集管或吸有肝素的注射器相连，以便于采血过程中管子或注射器的活动性。

3. 在前臂绕一止血带部分阻止静脉回流，将针头（斜面向上）插入静脉并慢慢抽血，

成人可达 60ml，但一周内不能超过 400ml。

4. 随着血液收集，去掉止血带，一手拔出针头，另一只手用纱布压住进针点，持续 3~5min，直到穿刺口封闭，并在静脉穿刺点放一无菌的绷带。

备选方案 淋巴细胞去除法取血

如用淋巴细胞去除法（也称白细胞清除术）获取血液，需要能够进行常规淋巴细胞去除的血库。使用一种初级的血细胞分离仪（如 Haemonetics V50 型血细胞分离系统），可收集少量血（约 30ml），通过离心将白细胞和红细胞分开；前者收集使用，后者回输供者（用同样的静脉进入位点取血），重复这一过程直到获得所需量的白细胞。此过程只能收集淋巴细胞和大部分巨噬细胞并去除粒细胞。或者说，可收集所有白细胞。一种 2 个单元的淋巴细胞去除器（1L），可从健康个体中分离得到 1×10^9 个细胞。整个过程需 1~2h。

用更为复杂的分离仪，如 Fenwal CS-3000（Baxter Healthcare），可连续分离白细胞和红细胞并收集和回输，需要一静脉进入点作为流出通道和另一静脉作为流入通道。用这种方法，可以处理 5L 的血液（可以获得多达 1×10^9 个单核细胞），整个过程历时 1.5h。

用细胞分离仪获得的单核细胞应当含有全血中的巨噬细胞，如果设置适当，只有很少量的粒细胞。然而，这种仪器也可以通过设置用于收集粒细胞。通过此种方法获得的细胞可能含有过多的血小板，可用淋巴细胞分离液（Ficoll）去除（单元 8.1）。

如果在细胞分离仪分离细胞时，使用酸-柠檬酸盐-葡萄糖右旋糖溶液作为抗凝剂，用 120ml 含 10%血清的 RPMI 的完全培养基悬浮细胞（附录 1），并按照单元 8.1 的方法洗涤细胞后方能使用或储存。

撰 稿 人：Warren Strober

[刘秋燕（附录 3）]

附录 4　试剂和设备的供应商

本附录列出了本指南中推荐的特殊产品的供应商的地址和电话，推荐这些供应商是因为：①他们的产品具有优越的性能；②在市场上难以找到这些产品。因此，本附录没有列出其他一些重要的生物产品的供应商。如果需要更全面详尽的供应信息，请参见 *Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents*（Santa Rosa，CA），*The Biotechnology Directory*（Stockton Press，New York），生物技术类杂志的年度供应指南，或者在互联网上查询相关信息。

A.C. Daniels
72-80 Akeman Street
Tring, Hertfordshire, HP23 6AJ, UK
(44) 1442 826881
FAX: (44) 1442 826880

A.D. Instruments
5111 Nations Crossing Road #8
Suite 2
Charlotte, NC 28217
(704) 522-8415　FAX: (704) 527-5005
http://www.us.endress.com

A.G. Scientific, Inc.
6450 Lusk Boulevard, Suite E102
San Diego, CA 92121
(877) 452-9925　FAX: (858) 452-9926
(858) 452-9925
http://www.agscientific.com/

A.J. Buck
11407 Cronhill Drive
Owings Mill, MD 21117
(800) 638-8673　FAX: (410) 581-1809
(410) 581-1800
http://www.ajbuck.com

A.M. Systems
131 Business Park Loop
P.O. Box 850
Carlsborg, WA 98324
(800) 426-1306　FAX: (360) 683-3525
(360) 683-8300
http://www.a-msystems.com

Aaron Medical Industries
7100 30th Avenue North
St. Petersburg, FL 33710
(727) 384-2323　FAX: (727) 347-9144
http://www.aaronmed.com

Abbott Laboratories
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064
(800) 323-9100　FAX: (847) 938-7424
http://www.abbott.com

ABCO Dealers
55 Church Street Central Plaza
Lowell, MA 01852
(800) 462-3326 (978) 459-6101
http://www.lomedco.com/abco.htm

Aber Instruments
5 Science Park
Aberystwyth, Wales SY23 3AH, UK
(44) 1970 636300
FAX: (44) 1970 615455
http://www.aber-instruments.co.uk

ABI Biotechnologies
See Perkin-Elmer

ABI Biotechnology
See Apotex

Access Technologies
Subsidiary of Norfolk Medical
7350 N. Ridgeway
Skokie, IL 60076
(877) 674-7131　FAX: (847) 674-7066
(847) 674-7131
http://www.norfolkaccess.com

Accurate Chemical and Scientific
300 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(800) 645-6264　FAX: (516) 997-4948
(516) 333-2221
http://www.accuratechemical.com

AccuScan Instruments
5090 Trabue Road
Columbus, OH 43228
(800) 822-1344　FAX: (614) 878-3560
(614) 878-6644
http://www.accuscan-usa.com

AccuStandard
125 Market Street
New Haven, CT 06513
(800) 442-5290　FAX: (877) 786-5287
http://www.accustandard.com

Accu-Tool Corp.
231 East Johnson Street
Cary, NC 27513
(919) 467-4665
http://plantfloor.com/nc/accu-toolcorp
.htm

Ace Glass
1430 NW Boulevard
Vineland, NJ 08360
(800) 223-4524　FAX: (800) 543-6752
(609) 692-3333

ACO Pacific
2604 Read Avenue
Belmont, CA 94002
(650) 595-8588　FAX: (650) 591-2891
http://www.acopacific.com

Acros Organic
See Fisher Scientific

Action Scientific
P.O. Box 1369
Carolina Beach, NC 28428
(910) 458-0401　FAX: (910) 458-0407

AD Instruments
1949 Landings Drive
Mountain View, CA 94043
(888) 965-6040　FAX: (650) 965-9293
(650) 965-9292
http://www.adinstruments.com

Adaptive Biosystems
15 Ribocon Way
Progress Park
Luton, Bedfordshire LU4 9UR, UK
(44)1 582-597676
FAX: (44)1 582-581495
http://www.adaptive.co.uk

Adobe Systems
1585 Charleston Road
P.O. Box 7900
Mountain View, CA 94039
(800) 833-6687　FAX: (415) 961-3769
(415) 961-4400
http://www.adobe.com

Advanced Bioscience Resources
1516 Oak Street, Suite 303
Alameda, CA 94501
(510) 865-5872　FAX: (510) 865-4090

Advanced Biotechnologies
9108 Guilford Road
Columbia, MD 21046
(800) 426-0764　FAX: (301) 497-9773
(301) 470-3220
http://www.abionline.com

Advanced ChemTech
5609 Fern Valley Road
Louisville, KY 40228
(502) 969-0000
http://www.peptide.com

Advanced Machining and Tooling
9850 Businesspark Avenue
San Diego, CA 92131
(858) 530-0751　FAX: (858) 530-0611
http://www.amtmfg.com

Advanced Magnetics
See PerSeptive Biosystems

Advanced Process Supply
See Naz-Dar-KC Chicago

Advanced Separation Technologies
37 Leslie Court
P.O. Box 297
Whippany, NJ 07981
(973) 428-9080　FAX: (973) 428-0152
http://www.astecusa.com

Advanced Targeting Systems
11175-A Flintkote Avenue
San Diego, CA 92121
(877) 889-2288　FAX: (858) 642-1989
(858) 642-1988
http://www.ATSbio.com

Advent Research Materials
Eynsham, Oxford OX29 4JA, UK
(44) 1865-884440
FAX: (44) 1865-84460
http://www.advent-rm.com

Advet
Industrivagen 24
S-972 54 Lulea, Sweden
(46) 0920-211887
FAX: (46) 0920-13773

Aesculap
1000 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
(800) 282-9000
http://www.aesculap.com

Affinity Chromatography
307 Huntingdon Road
Girton, Cambridge CB3 OJX, UK
(44) 1223 277192
FAX: (44) 1223 277502
http://www.affinity-chrom.com

Affinity Sensors
See Labsystems Affinity Sensors

Affymetrix
3380 Central Expressway
Santa Clara, CA 95051
(408) 731-5000　FAX: (408) 481-0422
(800) 362-2447
http://www.affymetrix.com

Agar Scientific
66a Cambridge Road
Stansted CM24 8DA, UK
(44) 1279-813-519
FAX: (44) 1279-815-106
http://www.agarscientific.com

A/G Technology
101 Hampton Avenue
Needham, MA 02494
(800) AGT-2535　FAX: (781) 449-5786
(781) 449-5774
http://www.agtech.com

Agen Biomedical Limited
11 Durbell Street
P.O. Box 391
Acacia Ridge 4110
Brisbane, Australia
61-7-3370-6300　FAX: 61-7-3370-6370
http://www.agen.com

Agilent Technologies
395 Page Mill Road
P.O. Box 10395
Palo Alto, CA 94306
(650) 752-5000
http://www.agilent.com/chem

Agouron Pharmaceuticals
10350 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(858) 622-3000　FAX: (858) 622-3298
http://www.agouron.com

Agracetus
8520 University Green
Middleton, WI 53562
(608) 836-7300　FAX: (608) 836-9710
http://www.monsanto.com

AIDS Research and Reference
Reagent Program
U.S. Department of Health and Human Services
625 Lofstrand Lane
Rockville, MD 20850
(301) 340-0245　FAX: (301) 340-9245
http://www.aidsreagent.org

AIN Plastics
249 East Sanford Boulevard
P.O. Box 151
Mt. Vernon, NY 10550
(914) 668-6800　FAX: (914) 668-8820
http://www.tincna.com

Air Products and Chemicals
7201 Hamilton Boulevard
Allentown, PA 18195
(800) 345-3148　FAX: (610) 481-4381
(610) 481-6799
http://www.airproducts.com

ALA Scientific Instruments
1100 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(516) 997-5780　FAX: (516) 997-0528
http://www.alascience.com

Aladin Enterprises
1255 23rd Avenue
San Francisco, CA 94122
(415) 468-0433　FAX: (415) 468-5607

Aladdin Systems
165 Westridge Drive
Watsonville, CA 95076
(831) 761-6200　FAX: (831) 761-6206
http://www.aladdinsys.com

Alcide
8561 154th Avenue NE
Redmond, WA 98052
(800) 543-2133　FAX: (425) 861-0173
(425) 882-2555
http://www.alcide.com

Aldrich Chemical
P.O. Box 2060
Milwaukee, WI 53201
(800) 558-9160　FAX: (800) 962-9591
(414) 273-3850　FAX: (414) 273-4979
http://www.aldrich.sial.com

Alexis Biochemicals
6181 Cornerstone Court East, Suite 103
San Diego, CA 92121
(800) 900-0065　FAX: (858) 658-9224
(858) 658-0065
http://www.alexis-corp.com

Alfa Aesar
30 Bond Street
Ward Hill, MA 10835
(800) 343-0660 FAX: (800) 322-4757
(978) 521-6300 FAX: (978) 521-6350
http://www.alfa.com

Alfa Laval
Avenue de Ble 5 -Bazellaan 5
BE-1140 Brussels, Belgium
32(2) 728 3811
FAX: 32(2) 728 3917 or 32(2) 728 3985
http://www.alfalaval.com

Alice King Chatham Medical Arts
11915-17 Inglewood Avenue
Hawthorne, CA 90250
(310) 970-1834 FAX: (310) 970-0121
(310) 970-1063

Allegiance Healthcare
800-964-5227
http://www.allegiance.net

Allelix Biopharmaceuticals
6850 Gorway Drive
Mississauga, Ontario
L4V 1V7 Canada
(905) 677-0831 FAX: (905) 677-9595
http://www.allelix.com

Allentown Caging Equipment
Route 526, P.O. Box 698
Allentown, NJ 08501
(800) 762-CAGE FAX: (609) 259-0449
(609) 259-7951
http://www.acecaging.com

Alltech Associates
Applied Science Labs
2051 Waukegan Road
P.O. Box 23
Deerfield, IL 60015
(800) 255-8324 FAX: (847) 948-1078
(847) 948-8600
http://www.alltechweb.com

Alomone Labs
HaMarpeh 5
P.O. Box 4287
Jerusalem 91042, Israel
972-2-587-2202 FAX: 972-2-587-1101
US: (800) 791-3904
FAX: (800) 791-3912
http://www.alomone.com

Alpha Innotech
14743 Catalina Street
San Leandro, CA 94577
(800) 795-5556 FAX: (510) 483-3227
(510) 483-9620
http://www.alphainnotech.com

Altec Plastics
116 B Street
Boston, MA 02127
(800) 477-8196 FAX: (617) 269-8484
(617) 269-1400

Alza
1900 Charleston Road P.O. Box 7210
Mountain View, CA 94043
(800) 692-2990 FAX: (650) 564-7070
(650) 564-5000
http://www.alza.com

Alzet
c/o Durect Corporation
P.O. Box 530
10240 Bubb Road
Cupertino, CA 95015
(800) 692-2990 FAX: (408) 865-1406
(408) 367-4036
http://www.alzet.com

Amac
160B Larrabee Road
Westbrook, ME 04092
(800) 458-5060 FAX: (207) 854-0116
(207) 854-0426

Amaresco
30175 Solon Industrial Parkway
Solon, Ohio 44139
(800) 366-1313 FAX: (440) 349-1182
(440) 349-1313

Ambion
2130 Woodward Street, Suite 200
Austin, TX 78744
(800) 888-8804 FAX: (512) 651-0190
(512) 651-0200
http://www.ambion.com

American Association of
Blood Banks
College of American Pathologists
325 Waukegan Road
Northfield, IL 60093
(800) 323-4040 FAX: (847) 8166
(847) 832-7000
http://www.cap.org

American Bio-Technologies
See Intracel Corporation

American Bioanalytical
15 Erie Drive
Natick, MA 01760
(800) 443-0600 FAX: (508) 655-2754
(508) 655-4336
http://www.americanbio.com

American Cyanamid
P.O. Box 400
Princeton, NJ 08543
(609) 799-0400 FAX: (609) 275-3502
http://www.cyanamid.com

American HistoLabs
7605-F Airpark Road
Gaithersburg, MD 20879
(301) 330-1200 FAX: (301) 330-6059

American International Chemical
17 Strathmore Road
Natick, MA 01760
(800) 238-0001 (508) 655-5805
http://www.aicma.com

American Laboratory Supply
See American Bioanalytical

American Medical Systems
10700 Bren Road West
Minnetonka, MN 55343
(800) 328-3881 FAX: (612) 930-6654
(612) 933-4666
http://www.visitams.com

American Qualex
920-A Calle Negocio
San Clemente, CA 92673
(949) 492-8298 FAX: (949) 492-6790
http://www.americanqualex.com

American Radiolabeled Chemicals
11624 Bowling Green
St. Louis, MO 63146
(800) 331-6661 FAX: (800) 999-9925
(314) 991-4545 FAX: (314) 991-4692
http://www.arc-inc.com

American Scientific Products
See VWR Scientific Products

American Society for Histocompatibility and Immunogenetics
P.O. Box 15804
Lenexa, KS 66285
(913) 541-0009 FAX: (913) 541-0156
http://www.swmed.edu/homepages/ASHI/ashi.htm

American Type Culture Collection (ATCC)
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110
(800) 638-6597 FAX: (703) 365-2750
(703) 365-2700
http://www.atcc.org

Amersham
See Amersham Pharmacia Biotech

Amersham International
Amersham Place
Little Chalfont, Buckinghamshire
HP7 9NA, UK
(44) 1494-544100
FAX: (44) 1494-544350
http://www.apbiotech.com

Amersham Medi-Physics
Also see Nycomed Amersham
3350 North Ridge Avenue
Arlington Heights, IL 60004
(800) 292-8514 FAX: (800) 807-2382
http://www.nycomed-amersham.com

Amersham Pharmacia Biotech
800 Centennial Avenue
P.O. Box 1327
Piscataway, NJ 08855
(800) 526-3593 FAX: (877) 295-8102
(732) 457-8000
http://www.apbiotech.com

Amgen
1 Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320
(800) 926-4369 FAX: (805) 498-9377
(805) 447-5725
http://www.amgen.com

Amicon
Scientific Systems Division
72 Cherry Hill Drive
Beverly, MA 01915
(800) 426-4266 FAX: (978) 777-6204
(978) 777-3622
http://www.amicon.com

Amika
8980F Route 108
Oakland Center
Columbia, MD 21045
(800) 547-6766 FAX: (410) 997-7104
(410) 997-0100
http://www.amika.com

Amoco Performance Products
See BPAmoco

AMPI
See Pacer Scientific

Amrad
576 Swan Street
Richmond, Victoria 3121, Australia
613-9208-4000
FAX: 613-9208-4350
http://www.amrad.com.au

Amresco
30175 Solon Industrial Parkway
Solon, OH 44139
(800) 829-2805 FAX: (440) 349-1182
(440) 349-1199

Anachemia Chemicals
3 Lincoln Boulevard
Rouses Point, NY 12979
(800) 323-1414 FAX: (518) 462-1952
(518) 462-1066
http://www.anachemia.com

Ana-Gen Technologies
4015 Fabian Way
Palo Alto, CA 94303
(800) 654-4671 FAX: (650) 494-3893
(650) 494-3894
http://www.ana-gen.com

Analox Instruments USA
P.O. Box 208
Lunenburg, MA 01462
(978) 582-9368 FAX: (978) 582-9588
http://www.analox.com

Analytical Biological Services
Cornell Business Park 701-4
Wilmington, DE 19801
(800) 391-2391 FAX: (302) 654-8046
(302) 654-4492
http://www.ABSbioreagents.com

Analytical Genetics Testing Center
7808 Cherry Creek S. Drive, Suite 201
Denver, CO 80231
(800) 204-4721 FAX: (303) 750-2171
(303) 750-2023
http://www.geneticid.com

AnaSpec
2149 O'Toole Avenue, Suite F
San Jose, CA 95131
(800) 452-5530 FAX: (408) 452-5059
(408) 452-5055
http://www.anaspec.com

Ancare
2647 Grand Avenue
P.O. Box 814
Bellmore, NY 11710
(800) 645-6379 FAX: (516) 781-4937
(516) 781-0755
http://www.ancare.com

Ancell
243 Third Street North
P.O. Box 87
Bayport, MN 55033
(800) 374-9523 FAX: (651) 439-1940
(651) 439-0835
http://www.ancell.com

Anderson Instruments
500 Technology Court
Smyrna, GA 30082
(800) 241-6898 FAX: (770) 319-5306
(770) 319-9999
http://www.graseby.com

Andreas Hettich
Gartenstrasse 100
Postfach 260
D-78732 Tuttlingen, Germany
(49) 7461 705 0
FAX: (49) 7461 705-122
http://www.hettich-centrifugen.de

Anesthetic Vaporizer Services
10185 Main Street
Clarence, NY 14031
(719) 759-8490
http://www.avapor.com

Animal Identification and Marking Systems (AIMS)
13 Winchester Avenue
Budd Lake, NJ 07828
(908) 684-9105 FAX: (908) 684-9106
http://www.animalid.com

Annovis
34 Mount Pleasant Drive
Aston, PA 19014
(800) EASY-DNA FAX: (610) 361-8255
(610) 361-9224
http://www.annovis.com

Apotex
150 Signet Drive
Weston, Ontario
M9L 1T9 Canada
(416) 749-9300 FAX: (416) 749-2646
http://www.apotex.com

Apple Scientific
11711 Chillicothe Road, Unit 2
P.O. Box 778
Chesterland, OH 44026
(440) 729-3056 FAX: (440) 729-0928
http://www.applesci.com

Applied Biosystems
See PE Biosystems

Applied Imaging
2380 Walsh Avenue, Bldg. B
Santa Clara, CA 95051
(800) 634-3622 FAX: (408) 562-0264
(408) 562-0250
http://www.aicorp.com

Applied Photophysics
203-205 Kingston Road
Leatherhead, Surrey
KT22 7PB UK
(44) 1372-386537

Applied Precision
1040 12th Avenue Northwest
Issaquah, Washington 98027
(425) 557-1000
FAX: (425) 557-1055
http://www.api.com/index.html

Appligene Oncor
Parc d'Innovation
Rue Geiler de Kaysersberg, BP 72
67402 Illkirch Cedex, France
(33) 88 67 22 67
FAX: (33) 88 67 19 45
http://www.oncor.com/prod-app.htm

Applikon
1165 Chess Drive, Suite G
Foster City, CA 94404
(650) 578-1396 FAX: (650) 578-8836
http://www.applikon.com

Appropriate Technical Resources
9157 Whiskey Bottom Road
Laurel, MD 20723
(800) 827-5931 FAX: (410) 792-2837
http://www.atrbiotech.com

APV Gaulin
100 S. CP Avenue
Lake Mills, WI 53551
(888) 278-4321 FAX: (888) 278-5329
http://www.apv.com

Aqualon
See Hercules Aqualon

Aquarium Systems
8141 Tyler Boulevard
Mentor, OH 44060
(800) 822-1100 FAX: (440) 255-8994
(440) 255-1997
http://www.aquariumsystems.com

Aquebogue Machine and Repair Shop
Box 2055
Main Road
Aquebogue, NY 11931
(631) 722-3635 FAX: (631) 722-3106

Archer Daniels Midland
4666 Faries Parkway
Decatur, IL 62525
(217) 424-5200
http://www.admworld.com

Archimica Florida
P.O. Box 1466
Gainesville, FL 32602
(800) 331-6313 FAX: (352) 371-6246
(352) 376-8246
http://www.archimica.com

Arcor Electronics
1845 Oak Street #15
Northfield, IL 60093
(847) 501-4848

Arcturus Engineering
400 Logue Avenue
Mountain View, CA 94043
(888) 446 7911 FAX: (650) 962 3039
(650) 962 3020
http://www.arctur.com

Ardais Corporation
One Ledgemont Center
128 Spring Street
Lexington, MA 02421
(781) 274-6420 (781) 274-6421
http://www.ardais.com

Argonaut Technologies
887 Industrial Road, Suite G
San Carlos, CA 94070
(650) 998-1350 FAX: (650) 598-1359
http://www.argotech.com

Ariad Pharmaceuticals
26 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139
(617) 494-0400 FAX: (617) 494-8144
http://www.ariad.com

Armour Pharmaceuticals
See Rhone-Poulenc Rorer

Aronex Pharmaceuticals
8707 Technology Forest Place
The Woodlands, TX 77381
(281) 367-1666 FAX: (281) 367-1676
http://www.aronex.com

Artisan Industries
73 Pond Street
Waltham, MA 02254
(617) 893-6800
http://www.artisanind.com

ASI Instruments
12900 Ten Mile Road
Warren, MI 48089
(800) 531-1105 FAX: (810) 756-9737
(810) 756-1222
http://www.asi-instruments.com

Aspen Research Laboratories
1700 Buerkle Road
White Bear Lake, MN 55140
(651) 264-6000 FAX: (651) 264-6270
http://www.aspenresearch.com

Associates of Cape Cod
704 Main Street
Falmouth, MA 02540
(800) LAL-TEST FAX: (508) 540-8680
(508) 540-3444
http://www.acciusa.com

Astra Pharmaceuticals
See AstraZeneca

AstraZeneca
1800 Concord Pike
Wilmington, DE 19850
(302) 886-3000 FAX: (302) 886-2972
http://www.astrazeneca.com

AT Biochem
30 Spring Mill Drive
Malvern, PA 19355
(610) 889-9300 FAX: (610) 889-9304

ATC Diagnostics
See Vysis

ATCC
See American Type Culture Collection

Athens Research and Technology
P.O. Box 5494
Athens, GA 30604
(706) 546-0207 FAX: (706) 546-7395

Atlanta Biologicals
1425-400 Oakbrook Drive
Norcross, GA 30093
(800) 780-7788 or (770) 446-1404
FAX: (800) 780-7374 or (770) 446-1404
http://www.atlantabio.com

Atomergic Chemical
71 Carolyn Boulevard
Farmingdale, NY 11735
(631) 694-9000 FAX: (631) 694-9177
http://www.atomergic.com

Atomic Energy of Canada
2251 Speakman Drive
Mississauga, Ontario
L5K 1B2 Canada
(905) 823-9040 FAX: (905) 823-1290
http://www.aecl.ca

ATR
P.O. Box 460
Laurel, MD 20725
(800) 827-5931 FAX: (410) 792-2837
(301) 470-2799
http://www.atrbiotech.com

Aurora Biosciences
11010 Torreyana Road
San Diego, CA 92121
(858) 404-6600 FAX: (858) 404-6714
http://www.aurorabio.com

Automatic Switch Company
A Division of Emerson Electric
50 Hanover Road
Florham Park, NJ 07932
(800) 937-2726 FAX: (973) 966-2628
(973) 966-2000
http://www.asco.com

Avanti Polar Lipids
700 Industrial Park Drive
Alabaster, AL 35007
(800) 227-0651 FAX: (800) 229-1004
(205) 663-2494 FAX: (205) 663-0756
http://www.avantilipids.com

Aventis
BP 67917
67917 Strasbourg Cedex 9, France
33 (0) 388 99 11 00
FAX: 33 (0) 388 99 11 01
http://www.aventis.com

Aventis Pasteur
1 Discovery Drive
Swiftwater, PA 18370
(800) 822-2463 FAX: (570) 839-0955
(570) 839-7187
http://www.aventispasteur.com/usa

Avery Dennison
150 North Orange Grove Boulevard
Pasadena, CA 91103
(800) 462-8379 FAX: (626) 792-7312
(626) 304-2000
http://www.averydennison.com

Avestin
2450 Don Reid Drive
Ottawa, Ontario
K1H 1E1 Canada
(888) AVESTIN FAX: (613) 736-8086
(613) 736-0019
http://www.avestin.com

AVIV Instruments
750 Vassar Avenue
Lakewood, NJ 08701
(732) 367-1663 FAX: (732) 370-0032
http://www.avivinst.com

Axon Instruments
1101 Chess Drive
Foster City, CA 94404
(650) 571-9400 FAX: (650) 571-9500
http://www.axon.com

Azon
720 Azon Road
Johnson City, NY 13790
(800) 847-9374 FAX: (800) 635-6042
(607) 797-2368
http://www.azon.com

BAbCO
1223 South 47th Street
Richmond, CA 94804
(800) 92-BABCO　FAX: (510) 412-8940
(510) 412-8930
http://www.babco.com

Bacharach
625 Alpha Drive
Pittsburgh, PA 15238
(800) 736-4666　FAX: (412) 963-2091
(412) 963-2000
http://www.bacharach-inc.com

Bachem Bioscience
3700 Horizon Drive
King of Prussia, PA 19406
(800) 634-3183　FAX: (610) 239-0800
(610) 239-0300
http://www.bachem.com

Bachem California
3132 Kashiwa Street
P.O. Box 3426
Torrance, CA 90510
(800) 422-2436　FAX: (310) 530-1571
(310) 539-4171
http://www.bachem.com

Baekon
18866 Allendale Avenue
Saratoga, CA 95070
(408) 972-8779　FAX: (408) 741-0944

Baker Chemical
See J.T. Baker

Bangs Laboratories
9025 Technology Drive
Fishers, IN 46038
(317) 570-7020　FAX: (317) 570-7034
http://www.bangslabs.com

Bard Parker
See Becton Dickinson

Barnstead/Thermolyne
P.O. Box 797
2555 Kerper Boulevard
Dubuque, IA 52004
(800) 446-6060　FAX: (319) 589-0516
http://www.barnstead.com

Barrskogen
4612 Laverock Place N
Washington, DC 20007
(800) 237-9192　FAX: (301) 464-7347

BAS
See Bioanalytical Systems

BASF
Specialty Products
3000 Continental Drive North
Mt. Olive, NJ 07828
(800) 669-2273　FAX: (973) 426-2610
http://www.basf.com

Baum, W.A.
620 Oak Street
Copiague, NY 11726
(631) 226-3940　FAX: (631) 226-3969
http://www.wabaum.com

Bausch & Lomb
One Bausch & Lomb Place
Rochester, NY 14604
(800) 344-8815　FAX: (716) 338-6007
(716) 338-6000
http://www.bausch.com

Baxter
Fenwal Division
1627 Lake Cook Road
Deerfield, IL 60015
(800) 766-1077　FAX: (800) 395-3291
(847) 940-6599　FAX: (847) 940-5766
http://www.powerfulmedicine.com

Baxter Healthcare
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015
(800) 777-2298　FAX: (847) 948-3948
(847) 948-2000
http://www.baxter.com

Baxter Scientific Products
See VWR Scientific

Bayer
Agricultural Division
Animal Health Products
12707 Shawnee Mission Pkwy.
Shawnee Mission, KS 66201
(800) 255-6517　FAX: (913) 268-2803
(913) 268-2000
http://www.bayerus.com

Bayer
Diagnostics Division (Order Services)
P.O. Box 2009
Mishiwaka, IN 46546
(800) 248-2637　FAX: (800) 863-6882
(219) 256-3390
http://www.bayer.com

Bayer Diagnostics
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591
(800) 255-3232　FAX: (914) 524-2132
(914) 631-8000
http://www.bayerdiag.com

Bayer Plc
Diagnostics Division
Bayer House, Strawberry Hill
Newbury, Berkshire RG14 1JA, UK
(44) 1635-563000
FAX: (44) 1635-563393
http://www.bayer.co.uk

BD Immunocytometry Systems
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131
(800) 223-8226　FAX: (408) 954-BDIS
http://www.bdfacs.com

BD Labware
Two Oak Park
Bedford, MA 01730
(800) 343-2035　FAX: (800) 743-6200
http://www.bd.com/labware

BD PharMingen
10975 Torreyana Road
San Diego, CA 92121
(800) 848-6227　FAX: (858) 812-8888
(858) 812-8800
http://www.pharmingen.com

BD Transduction Laboratories
133 Venture Court
Lexington, KY 40511
(800) 227-4063　FAX: (606) 259-1413
(606) 259-1550
http://www.translab.com

BDH Chemicals
Broom Road
Poole, Dorset BH12 4NN, UK
(44) 1202-745520
FAX: (44) 1202-2413720

BDH Chemicals
See Hoefer Scientific Instruments

BDIS
See BD Immunocytometry Systems

Beckman Coulter
4300 North Harbor Boulevard
Fullerton, CA 92834
(800) 233-4685　FAX: (800) 643-4366
(714) 871-4848
http://www.beckman-coulter.com

Beckman Instruments
Spinco Division/Bioproducts Operation
1050 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304
(800) 742-2345　FAX: (415) 859-1550
(415) 857-1150
http://www.beckman-coulter.com

Becton Dickinson Immunocytometry & Cellular Imaging
2350 Qume Drive
San Jose, CA 95131
(800) 223-8226　FAX: (408) 954-2007
(408) 432-9475
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Labware
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417
(888) 237-2762　FAX: (800) 847-2220
(201) 847-4222
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Labware
2 Bridgewater Lane
Lincoln Park, NJ 07035
(800) 235-5953　FAX: (800) 847-2220
(201) 847-4222
http://www.bdfacs.com

Becton Dickinson Primary Care Diagnostics
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152
(800) 675-0908 FAX: (410) 316-4723
(410) 316-4000
http://www.bdfacs.com

Behringwerke Diagnostika
Hoechster Strasse 70
P-65835 Liederback, Germany
(49) 69-30511 FAX: (49) 69-303-834

Bellco Glass
340 Edrudo Road
Vineland, NJ 08360
(800) 257-7043 FAX: (856) 691-3247
(856) 691-1075
http://www.bellcoglass.com

Bender Biosystems
See Serva

Beral Enterprises
See Garren Scientific

Berkeley Antibody
See BAbCO

Bernsco Surgical Supply
25 Plant Avenue
Hauppague, NY 11788
(800) TIEMANN FAX: (516) 273-6199
(516) 273-0005
http://www.bernsco.com

Beta Medical and Scientific
(Datesand Ltd.)
2 Ferndale Road
Sale, Manchester M33 3GP, UK
(44) 1612 317676
FAX: (44) 1612 313656

Bethesda Research Laboratories (BRL)
See Life Technologies

Biacore
200 Centennial Avenue, Suite 100
Piscataway, NJ 08854
(800) 242-2599 FAX: (732) 885-5669
(732) 885-5618
http://www.biacore.com

Bilaney Consultants
St. Julian's
Sevenoaks, Kent TN15 0RX, UK
(44) 1732 450002
FAX: (44) 1732 450003
http://www.bilaney.com

Binding Site
5889 Oberlin Drive, Suite 101
San Diego, CA 92121
(800) 633-4484 FAX: (619) 453-9189
(619) 453-9177
http://www.bindingsite.co.uk

BIO 101
See Qbiogene

Bio Image
See Genomic Solutions

Bioanalytical Systems
2701 Kent Avenue
West Lafayette, IN 47906
(800) 845-4246 FAX: (765) 497-1102
(765) 463-4527
http://www.bioanalytical.com

Biocell
2001 University Drive
Rancho Dominguez, CA 90220
(800) 222-8382 FAX: (310) 637-3927
(310) 537-3300
http://www.biocell.com

Biocoat
See BD Labware

BioComp Instruments
650 Churchill Road
Fredericton, New Brunswick
E3B 1P6 Canada
(800) 561-4221 FAX: (506) 453-3583
(506) 453-4812
http://131.202.97.21

BioDesign
P.O. Box 1050
Carmel, NY 10512
(914) 454-6610 FAX: (914) 454-6077
http://www.biodesignofny.com

BioDiscovery
4640 Admiralty Way, Suite 710
Marina Del Rey, CA 90292
(310) 306-9310 FAX: (310) 306-9109
http://www.biodiscovery.com

Bioengineering AG
Sagenrainstrasse 7
CH8636 Wald, Switzerland
(41) 55-256-8-111
FAX: (41) 55-256-8-256

Biofluids
Division of Biosource International
1114 Taft Street
Rockville, MD 20850
(800) 972-5200 FAX: (301) 424-3619
(301) 424-4140
http://www.biosource.com

BioFX Laboratories
9633 Liberty Road, Suite S
Randallstown, MD 21133
(800) 445-6447 FAX: (410) 498-6008
(410) 496-6006
http://www.biofx.com

BioGenex Laboratories
4600 Norris Canyon Road
San Ramon, CA 94583
(800) 421-4149 FAX: (925) 275-0580
(925) 275-0550
http://www.biogenex.com

Bioline
2470 Wrondel Way
Reno, NV 89502
(888) 257-5155 FAX: (775) 828-7676
(775) 828-0202
http://www.bioline.com

Bio-Logic Research & Development
1, rue de l-Europe
A.Z. de Font-Ratel
38640 CLAIX, France
(33) 76-98-68-31
FAX: (33) 76-98-69-09

Biological Detection Systems
See Cellomics or Amersham

Biomeda
1166 Triton Drive, Suite E
P.O. Box 8045
Foster City, CA 94404
(800) 341-8787 FAX: (650) 341-2299
(650) 341-8787
http://www.biomeda.com

BioMedic Data Systems
1 Silas Road
Seaford, DE 19973
(800) 526-2637 FAX: (302) 628-4110
(302) 628-4100
http://www.bmds.com

Biomedical Engineering
P.O. Box 980694
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA 23298
(804) 828-9829 FAX: (804) 828-1008

Biomedical Research Instruments
12264 Wilkins Avenue
Rockville, MD 20852
(800) 327-9498
(301) 881-7911
http://www.biomedinstr.com

Bio/medical Specialties
P.O. Box 1687
Santa Monica, CA 90406
(800) 269-1158 FAX: (800) 269-1158
(323) 938-7515

BioMerieux
100 Rodolphe Street
Durham, North Carolina 27712
(919) 620-2000
http://www.biomerieux.com

BioMetallics
P.O. Box 2251
Princeton, NJ 08543
(800) 999-1961 FAX: (609) 275-9485
(609) 275-0133
http://www.microplate.com

Biomol Research Laboratories
5100 Campus Drive
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 942-0430 FAX: (610) 941-9252
(610) 941-0430
http://www.biomol.com

Bionique Testing Labs
Fay Brook Drive
RR 1, Box 196
Saranac Lake, NY 12983
(518) 891-2356 FAX: (518) 891-5753
http://www.bionique.com

Biopac Systems
42 Aero Camino
Santa Barbara, CA 93117
(805) 685-0066 FAX: (805) 685-0067
http://www.biopac.com

Bioproducts for Science
See Harlan Bioproducts for Science

Bioptechs
3560 Beck Road
Butler, PA 16002
(877) 548-3235 FAX: (724) 282-0745
(724) 282-7145
http://www.bioptechs.com

BIOQUANT-R&M Biometrics
5611 Ohio Avenue
Nashville, TN 37209
(800) 221-0549 (615) 350-7866
FAX: (615) 350-7282
http://www.bioquant.com

Bio-Rad Laboratories
2000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547
(800) 424-6723 FAX: (800) 879-2289
(510) 741-1000 FAX: (510) 741-5800
http://www.bio-rad.com

Bio-Rad Laboratories
Maylands Avenue
Hemel Hempstead, Herts HP2 7TD, UK
http://www.bio-rad.com

Bioreclamation
492 Richmond Road
East Meadow, NY 11554
(516) 483-1196 FAX: (516) 483-4683
http://www.bioreclamation.com

BioRobotics
3-4 Bennell Court
Comberton, Cambridge CB3 7DS, UK
(44) 1223-264345
FAX: (44) 1223-263933
http://www.biorobotics.co.uk

BIOS Laboratories
See Genaissance Pharmaceuticals

Biosearch Technologies
81 Digital Drive
Novato, CA 94949
(800) GENOME1 FAX: (415) 883-8488
(415) 883-8400
http://www.biosearchtech.com

BioSepra
111 Locke Drive
Marlborough, MA 01752
(800) 752-5277 FAX: (508) 357-7595
(508) 357-7500
http://www.biosepra.com

Bio-Serv
1 8th Street, Suite 1
Frenchtown, NJ 08825
(908) 996-2155 FAX: (908) 996-4123
http://www.bio-serv.com

BioSignal
1744 William Street, Suite 600
Montreal, Quebec
H3J 1R4 Canada
(800) 293-4501 FAX: (514) 937-0777
(514) 937-1010
http://www.biosignal.com

Biosoft
P.O. Box 10938
Ferguson, MO 63135
(314) 524-8029 FAX: (314) 524-8129
http://www.biosoft.com

Biosource International
820 Flynn Road
Camarillo, CA 93012
(800) 242-0607 FAX: (805) 987-3385
(805) 987-0086
http://www.biosource.com

BioSpec Products
P.O. Box 788
Bartlesville, OK 74005
(800) 617-3363 FAX: (918) 336-3363
(918) 336-3363
http://www.biospec.com

Biosure
See Riese Enterprises

Biosym Technologies
See Molecular Simulations

Biosys
21 quai du Clos des Roses
602000 Compiegne, France
(33) 03 4486 2275
FAX: (33) 03 4484 2297

Bio-Tech Research Laboratories
NIAID Repository
Rockville, MD 20850
http://www.niaid.nih.gov/ncn/repos.htm

Biotech Instruments
Biotech House
75A High Street
Kimpton, Hertfordshire SG4 8PU, UK
(44) 1438 832555
FAX: (44) 1438 833040
http://www.biotinst.demon.co.uk

Biotech International
11 Durbell Street
Acacia Ridge, Queensland 4110
Australia
61-7-3370-6396
FAX: 61-7-3370-6370
http://www.avianbiotech.com

Biotech Source
Inland Farm Drive
South Windham, ME 04062
(207) 892-3266 FAX: (207) 892-6774

Bio-Tek Instruments
Highland Industrial Park
P.O. Box 998
Winooski, VT 05404
(800) 451-5172 FAX: (802) 655-7941
(802) 655-4040
http://www.biotek.com

Biotecx Laboratories
6023 South Loop East
Houston, TX 77033
(800) 535-6286 FAX: (713) 643-3143
(713) 643-0606
http://www.biotecx.com

BioTherm
3260 Wilson Boulevard
Arlington, VA 22201
(703) 522-1705 FAX: (703) 522-2606

Bioventures
P.O. Box 2561
848 Scott Street
Murfreesboro, TN 37133
(800) 235-8938 FAX: (615) 896-4837
http://www.bioventures.com

BioWhittaker
8830 Biggs Ford Road
P.O. Box 127
Walkersville, MD 21793
(800) 638-8174 FAX: (301) 845-8338
(301) 898-7025
http://www.biowhittaker.com

Biozyme Laboratories
9939 Hibert Street, Suite 101
San Diego, CA 92131
(800) 423-8199 FAX: (858) 549-0138
(858) 549-4484
http://www.biozyme.com

Bird Products
1100 Bird Center Drive
Palm Springs, CA 92262
(800) 328-4139 FAX: (760) 778-7274
(760) 778-7200
http://www.birdprod.com/bird

B & K Universal
2403 Yale Way
Fremont, CA 94538
(800) USA-MICE FAX: (510) 490-3036

BLS Ltd.
Zselyi Aladar u. 31
1165 Budapest, Hungary
(36) 1-407-2602 FAX: (36) 1-407-2896
http://www.bls-ltd.com

Blue Sky Research
3047 Orchard Parkway
San Jose, CA 95134
(408) 474-0988 FAX: (408) 474-0989
http://www.blueskyresearch.com

Blumenthal Industries
7 West 36th Street, 13th floor
New York, NY 10018
(212) 719-1251 FAX: (212) 594-8828

BOC Edwards
One Edwards Park
301 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 848-9800 FAX: (978) 658-7969
(978) 658-5410
http://www.bocedwards.com

Boehringer Ingelheim
900 Ridgebury Road
P.O. Box 368
Ridgefield, CT 06877
(800) 243-0127 FAX: (203) 798-6234
(203) 798-9988
http://www.boehringer-ingelheim.com

Boehringer Mannheim
Biochemicals Division
See Roche Diagnostics

Boekel Scientific
855 Pennsylvania Boulevard
Feasterville, PA 19053
(800) 336-6929 FAX: (215) 396-8264
(215) 396-8200
http://www.boekelsci.com

Bohdan Automation
1500 McCormack Boulevard
Mundelein, IL 60060
(708) 680-3939 FAX: (708) 680-1199

BPAmoco
4500 McGinnis Ferry Road
Alpharetta, GA 30005
(800) 328-4537 FAX: (770) 772-8213
(770) 772-8200
http://www.bpamoco.com

Brain Research Laboratories
Waban P.O. Box 88
Newton, MA 02468
(888) BRL-5544 FAX: (617) 965-6220
(617) 965-5544
http://www.brainresearchlab.com

Braintree Scientific
P.O. Box 850929
Braintree, MA 02185
(781) 843-1644 FAX: (781) 982-3160
http://www.braintreesci.com

Brandel
8561 Atlas Drive
Gaithersburg, MD 20877
(800) 948-6506 FAX: (301) 869-5570
(301) 948-6506
http://www.brandel.com

Branson Ultrasonics
41 Eagle Road
Danbury, CT 06813
(203) 796-0400 FAX: (203) 796-9838
http://www.plasticsnet.com/branson

B. Braun Biotech
999 Postal Road
Allentown, PA 18103
(800) 258-9000 FAX: (610) 266-9319
(610) 266-6262
http://www.bbraunbiotech.com

B. Braun Biotech International
Schwarzenberg Weg 73-79
P.O. Box 1120
D-34209 Melsungen, Germany
(49) 5661-71-3400
FAX: (49) 5661-71-3702
http://www.bbraunbiotech.com

B. Braun-McGaw
2525 McGaw Avenue
Irvine, CA 92614
(800) BBRAUN-2 (800) 624-2963
http://www.bbraunusa.com

B. Braun Medical
Thorncliffe Park
Sheffield S35 2PW, UK
(44) 114-225-9000
FAX: (44) 114-225-9111
http://www.bbmuk.demon.co.uk

Brenntag
P.O. Box 13788
Reading, PA 19612-3788
(610) 926-4151 FAX: (610) 926-4160
http://www.brenntagnortheast.com

Bresatec
See GeneWorks

Bright/Hacker Instruments
17 Sherwood Lane
Fairfield, NJ 07004
(973) 226-8450 FAX: (973) 808-8281
http://www.hackerinstruments.com

Brinkmann Instruments
Subsidiary of Sybron
1 Cantiague Road
P.O. Box 1019
Westbury, NY 11590
(800) 645-3050 FAX: (516) 334-7521
(516) 334-7500
http://www.brinkmann.com

Bristol-Meyers Squibb
P.O. Box 4500
Princeton, NJ 08543
(800) 631-5244 FAX: (800) 523-2965
http://www.bms.com

Broadley James
19 Thomas
Irvine, CA 92618
(800) 288-2833 FAX: (949) 829-5560
(949) 829-5555
http://www.broadleyjames.com

Brookhaven Instruments
750 Blue Point Road
Holtsville, NY 11742
(631) 758-3200 FAX: (631) 758-3255
http://www.bic.com

Brownlee Labs
See Applied Biosystems
Distributed by Pacer Scientific

Bruel & Kjaer
Division of Spectris Technologies
2815 Colonnades Court
Norcross, GA 30071
(800) 332-2040 FAX: (770) 847-8440
(770) 209-6907
http://www.bkhome.com

Bruker Analytical X-Ray Systems
5465 East Cheryl Parkway
Madison, WI 53711
(800) 234-XRAY FAX: (608) 276-3006
(608) 276-3000
http://www.bruker-axs.com

Bruker Instruments
19 Fortune Drive
Billerica, MA 01821
(978) 667-9580 FAX: (978) 667-0985
http://www.bruker.com

BTX
Division of Genetronics
11199 Sorrento Valley Road
San Diego, CA 92121
(800) 289-2465 FAX: (858) 597-9594
(858) 597-6006
http://www.genetronics.com/btx

Buchler Instruments
See Baxter Scientific Products

Buckshire
2025 Ridge Road
Perkasie, PA 18944
(215) 257-0116

Burdick and Jackson
Division of Baxter Scientific Products
1953 S. Harvey Street
Muskegon, MI 49442
(800) 368-0050 FAX: (231) 728-8226
(231) 726-3171
http://www.bandj.com/mainframe.htm

Burleigh Instruments
P.O. Box E
Fishers, NY 14453
(716) 924-9355 FAX: (716) 924-9072
http://www.burleigh.com

Burns Veterinary Supply
1900 Diplomat Drive
Farmer's Branch, TX 75234
(800) 92-BURNS FAX: (972) 243-6841
http://www.burnsvet.com

Burroughs Wellcome
See Glaxo Wellcome

The Butler Company
5600 Blazer Parkway
Dublin, OH 43017
(800) 551-3861 FAX: (614) 761-9096
(614) 761-9095
http://www.wabutler.com

Butterworth Laboratories
54-56 Waldegrave Road
Teddington, Middlesex
TW11 8LG, UK
(44)(0)20-8977-0750
FAX: (44)(0)28-8943-2624
http://www.butterworth-labs.co.uk

Buxco Electronics
95 West Wood Road #2
Sharon, CT 06069
(860) 364-5558 FAX: (860) 364-5116
http://www.buxco.com

C/D/N Isotopes
88 Leacock Street
Pointe-Claire, Quebec
H9R 1H1 Canada
(800) 697-6254 FAX: (514) 697-6148

C.M.A./Microdialysis AB
73 Princeton Street
North Chelmsford, MA 01863
(800) 440-4980 FAX: (978) 251-1950
(978) 251-1940
http://www.microdialysis.com

Calbiochem-Novabiochem
P.O. Box 12087-2087
La Jolla, CA 92039
(800) 854-3417 FAX: (800) 776-0999
(858) 450-9600
http://www.calbiochem.com

California Fine Wire
338 South Fourth Street
Grover Beach, CA 93433
(805) 489-5144 FAX: (805) 489-5352
http://www.calfinewire.com

Calorimetry Sciences
155 West 2050 North
Spanish Fork, UT 84660
(801) 794-2600 FAX: (801) 794-2700
http://www.calscorp.com

Caltag Laboratories
1849 Bayshore Highway, Suite 200
Burlingame, CA 94010
(800) 874-4007 FAX: (650) 652-9030
(650) 652-0468
http://www.caltag.com

Cambridge Electronic Design
Science Park, Milton Road
Cambridge CB4 0FE, UK
44 (0) 1223-420-186
FAX: 44 (0) 1223-420-488
http://www.ced.co.uk

Cambridge Isotope Laboratories
50 Frontage Road
Andover, MA 01810
(800) 322-1174 FAX: (978) 749-2768
(978) 749-8000
http://www.isotope.com

Cambridge Research Biochemicals
See Zeneca/CRB

Cambridge Technology
109 Smith Place
Cambridge, MA 02138
(6l7) 441-0600 FAX: (617) 497-8800
http://www.camtech.com

Camlab
Nuffield Road
Cambridge CB4 1TH, UK
(44) 122-3424222
FAX: (44) 122-3420856
http://www.camlab.co.uk/home.htm

Campden Instruments
Park Road
Sileby Loughborough
Leicestershire LE12 7TU, UK
(44) 1509-814790
FAX: (44) 1509-816097
http://www.campden-inst.com/home.htm

Cappel Laboratories
See Organon Teknika Cappel

Carl Roth GmgH & Company
Schoemperlenstrasse 1-5
76185 Karlsrube
Germany
(49) 72-156-06164
FAX: (49) 72-156-06264
http://www.carl-roth.de

Carl Zeiss
One Zeiss Drive
Thornwood, NY 10594
(800) 233-2343 FAX: (914) 681-7446
(914) 747-1800
http://www.zeiss.com

Carlo Erba Reagenti
Via Winckelmann 1
20148 Milano
Lombardia, Italy
(39) 0-29-5231
FAX: (39) 0-29-5235-904
http://www.carloerbareagenti.com

Carolina Biological Supply
2700 York Road
Burlington, NC 27215
(800) 334-5551 FAX: (336) 584-76869
(336) 584-0381
http://www.carolina.com

Carolina Fluid Components
9309 Stockport Place
Charlotte, NC 28273
(704) 588-6101 FAX: (704) 588-6115
http://www.cfcsite.com

Cartesian Technologies
17851 Skypark Circle, Suite C
Irvine, CA 92614
(800) 935-8007
http://cartesiantech.com

Cayman Chemical
1180 East Ellsworth Road
Ann Arbor, MI 48108
(800) 364-9897 FAX: (734) 971-3640
(734) 971-3335
http://www.caymanchem.com

CB Sciences
One Washington Street, Suite 404
Dover, NH 03820
(800) 234-1757 FAX: (603) 742-2455
http://www.cbsci.com

CBS Scientific
P.O. Box 856
Del Mar, CA 92014
(800) 243-4959 FAX: (858) 755-0733
(858) 755-4959
http://www.cbssci.com

CCR (Coriell Cell Repository)
See Coriell Institute for Medical Research

CE Instruments
Grand Avenue Parkway
Austin, TX 78728
(800) 876-6711 FAX: (512) 251-1597
http://www.ceinstruments.com

Cedarlane Laboratories
5516 8th Line, R.R. #2
Hornby, Ontario
L0P 1E0 Canada
(905) 878-8891 FAX: (905) 878-7800
http://www.cedarlanelabs.com

CEL Associates
P.O. Box 721854
Houston, TX 77272
(800) 537-9339 FAX: (281) 933-0922
(281) 933-9339
http://www.cel-1.com

Cel-Line Associates
See Erie Scientific

Celite World Minerals
130 Castilian Drive
Santa Barbara, CA 93117
(805) 562-0200 FAX: (805) 562-0299
http://www.worldminerals.com/celite

Cell Genesys
342 Lakeside Drive
Foster City, CA 94404
(650) 425-4400 FAX: (650) 425-4457
http://www.cellgenesys.com

Cell Systems
12815 NE 124th Street, Suite A
Kirkland, WA 98034
(800) 697-1211 FAX: (425) 820-6762
(425) 823-1010

Cellmark Diagnostics
20271 Goldenrod Lane
Germantown, MD 20876
(800) 872-5227 FAX: (301) 428-4877
(301) 428-4980
http://www.cellmark-labs.com

Cellomics
635 William Pitt Way
Pittsburgh, PA 15238
(888) 826-3857 FAX: (412) 826-3850
(412) 826-3600
http://www.cellomics.com

Celltech
216 Bath Road
Slough, Berkshire SL1 4EN, UK
(44) 1753 534655
FAX: (44) 1753 536632
http://www.celltech.co.uk

Cellular Products
872 Main Street
Buffalo, NY 14202
(800) CPI-KITS FAX: (716) 882-0959
(716) 882-0920
http://www.zeptometrix.com

CEM
P.O. Box 200
Matthews, NC 28106
(800) 726-3331

Centers for Disease Control
1600 Clifton Road NE
Atlanta, GA 30333
(800) 311-3435 FAX: (888) 232-3228
(404) 639-3311
http://www.cdc.gov

CERJ
Centre d'Elevage Roger Janvier
53940 Le Genest Saint Isle
France

Cetus
See Chiron

Chance Propper
Warly, West Midlands B66 1NZ, UK
(44)(0)121-553-5551
FAX: (44)(0)121-525-0139

Charles River Laboratories
251 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 522-7287 FAX: (978) 658-7132
(978) 658-6000
http://www.criver.com

Charm Sciences
36 Franklin Street
Malden, MA 02148
(800) 343-2170 FAX: (781) 322-3141
(781) 322-1523
http://www.charm.com

Chase-Walton Elastomers
29 Apsley Street
Hudson, MA 01749
(800) 448-6289 FAX: (978) 562-5178
(978) 568-0202
http://www.chase-walton.com

ChemGenes
Ashland Technology Center
200 Homer Avenue
Ashland, MA 01721
(800) 762-9323 FAX: (508) 881-3443
(508) 881-5200
http://www.chemgenes.com

Chemglass
3861 North Mill Road
Vineland, NJ 08360
(800) 843-1794 FAX: (856) 696-9102
(800) 696-0014
http://www.chemglass.com

Chemicon International
28835 Single Oak Drive
Temecula, CA 92590
(800) 437-7500 FAX: (909) 676-9209
(909) 676-8080
http://www.chemicon.com

Chem-Impex International
935 Dillon Drive
Wood Dale, IL 60191
(800) 869-9290 FAX: (630) 766-2218
(630) 766-2112
http://www.chemimpex.com

Chem Service
P.O. Box 599
West Chester, PA 19381-0599
(610) 692-3026 FAX: (610) 692-8729
http://www.chemservice.com

Chemsyn Laboratories
13605 West 96th Terrace
Lenexa, KS 66215
(913) 541-0525 FAX: (913) 888-3582
http://www.tech.epcorp.com/ChemSyn/chemsyn.htm

Chemunex USA
1 Deer Park Drive, Suite H-2
Monmouth Junction, NJ 08852
(800) 411-6734
http://www.chemunex.com

Cherwell Scientific Publishing
The Magdalen Centre
Oxford Science Park
Oxford OX44GA, UK
(44)(1) 865-784-800
FAX: (44)(1) 865-784-801
http://www.cherwell.com

ChiRex Cauldron
383 Phoenixville Pike
Malvern, PA 19355
(610) 727-2215 FAX: (610) 727-5762
http://www.chirex.com

Chiron Diagnostics
See Bayer Diagnostics

Chiron Mimotopes Peptide Systems
See Multiple Peptide Systems

Chiron
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608
(800) 244-7668 FAX: (510) 655-9910
(510) 655-8730
http://www.chiron.com

Chrom Tech
P.O. Box 24248
Apple Valley, MN 55124
(800) 822-5242 FAX: (952) 431-6345
http://www.chromtech.com

Chroma Technology
72 Cotton Mill Hill, Unit A-9
Brattleboro, VT 05301
(800) 824-7662 FAX: (802) 257-9400
(802) 257-1800
http://www.chroma.com

Chromatographie
ZAC de Moulin No. 2
91160 Saulx les Chartreux
France
(33) 01-64-54-8969
FAX: (33) 01-69-0988091
http://www.chromatographie.com

Chromogenix
Taljegardsgatan 3
431-53 Mlndal, Sweden
(46) 31-706-20-70
FAX: (46) 31-706-20-80
http://www.chromogenix.com

Chrompack USA
c/o Varian USA
2700 Mitchell Drive
Walnut Creek, CA 94598
(800) 526-3687 FAX: (925) 945-2102
(925) 939-2400
http://www.chrompack.com

Chugai Biopharmaceuticals
6275 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(858) 535-5900 FAX: (858) 546-5973
http://www.chugaibio.com

Ciba-Corning Diagnostics
See Bayer Diagnostics

Ciba-Geigy
See Ciba Specialty Chemicals or Novartis Biotechnology

Ciba Specialty Chemicals
540 White Plains Road
Tarrytown, NY 10591
(800) 431-1900 FAX: (914) 785-2183
(914) 785-2000
http://www.cibasc.com

Ciba Vision
Division of Novartis AG
11460 Johns Creek Parkway
Duluth, GA 30097
(770) 476-3937
http://www.cvworld.com

Cidex
Advanced Sterilization Products
33 Technology Drive
Irvine, CA 92618
(800) 595-0200 (949) 581-5799
http://www.cidex.com/ASPnew.htm

Cinna Scientific
Subsidiary of Molecular Research Center
5645 Montgomery Road
Cincinnati, OH 45212
(800) 462-9868 FAX: (513) 841-0080
(513) 841-0900
http://www.mrcgene.com

Cistron Biotechnology
10 Bloomfield Avenue
Pine Brook, NJ 07058
(800) 642-0167 FAX: (973) 575-4854
(973) 575-1700
http://www.cistronbio.com

Clark Electromedical Instruments
See Harvard Apparatus

Clay Adam
See Becton Dickinson Primary Care Diagnostics

CLB (Central Laboratory of the Netherlands)
Blood Transfusion Service
P.O. Box 9190
1006 AD Amsterdam, The Netherlands
(31) 20-512-9222
FAX: (31) 20-512-3332

Cleveland Scientific
P.O. Box 300
Bath, OH 44210
(800) 952-7315 FAX: (330) 666-2240
http://www.clevelandscientific.com

Clonetics
Division of BioWhittaker
http://www.clonetics.com
Also see BioWhittaker

Clontech Laboratories
1020 East Meadow Circle
Palo Alto, CA 94303
(800) 662-2566 FAX: (800) 424-1350
(650) 424-8222 FAX: (650) 424-1088
http://www.clontech.com

Closure Medical Corporation
5250 Greens Dairy Road
Raleigh, NC 27616
(919) 876-7800 FAX: (919) 790-1041
http://www.closuremed.com

CMA Microdialysis AB
73 Princeton Street
North Chelmsford, MA 01863
(800) 440-4980 FAX: (978) 251-1950
(978) 251 1940
http://www.microdialysis.com

Cocalico Biologicals
449 Stevens Road
P.O. Box 265
Reamstown, PA 17567
(717) 336-1990 FAX: (717) 336-1993

Coherent Laser
5100 Patrick Henry Drive
Santa Clara, CA 95056
(800) 227-1955 FAX: (408) 764-4800
(408) 764-4000
http://www.cohr.com

Cohu
P.O. Box 85623
San Diego, CA 92186
(858) 277-6700 FAX: (858) 277-0221
http://www.COHU.com/cctv

Cole-Parmer Instrument
625 East Bunker Court
Vernon Hills, IL 60061
(800) 323-4340 FAX: (847) 247-2929
(847) 549-7600
http://www.coleparmer.com

Collaborative Biomedical Products and **Collaborative Research**
See Becton Dickinson Labware

Collagen Aesthetics
1850 Embarcadero Road
Palo Alto, CA 94303
(650) 856-0200 FAX: (650) 856-0533
http://www.collagen.com

Collagen Corporation
See Collagen Aesthetics

College of American Pathologists
325 Waukegan Road
Northfield, IL 60093
(800) 323-4040 FAX: (847) 832-8000
(847) 446-8800
http://www.cap.org/index.cfm

Colonial Medical Supply
504 Wells Road
Franconia, NH 03580
(603) 823-9911 FAX: (603) 823-8799
http://www.colmedsupply.com

Colorado Serum
4950 York Street
Denver, CO 80216
(800) 525-2065 FAX: (303) 295-1923
http://www.colorado-serum.com

Columbia Diagnostics
8001 Research Way
Springfield, VA 22153
(800) 336-3081 FAX: (703) 569-2353
(703) 569-7511
http://www.columbiadiagnostics.com

Columbus Instruments
950 North Hague Avenue
Columbus, OH 43204
(800) 669-5011 FAX: (614) 276-0529
(614) 276-0861
http://www.columbusinstruments.com

Computer Associates International
One Computer Associates Plaza
Islandia, NY 11749
(631) 342-6000 FAX: (631) 342-6800
http://www.cai.com

Connaught Laboratories
See Aventis Pasteur

Connectix
2955 Campus Drive, Suite 100
San Mateo, CA 94403
(800) 950-5880 FAX: (650) 571-0850
(650) 571-5100
http://www.connectix.com

Contech
99 Hartford Avenue
Providence, RI 02909
(401) 351-4890 FAX: (401) 421-5072
http://www.iol.ie/~burke/contech.html

Continental Laboratory Products
5648 Copley Drive
San Diego, CA 92111
(800) 456-7741 FAX: (858) 279-5465
(858) 279-5000
http://www.conlab.com

ConvaTec
Professional Services
P.O. Box 5254
Princeton, NJ 08543
(800) 422-8811
http://www.convatec.com

Cooper Instruments & Systems
P.O. Box 3048
Warrenton, VA 20188
(800) 344-3921 FAX: (540) 347-4755
(540) 349-4746
http://www.cooperinstruments.com

Cooperative Human Tissue Network
(866) 462-2486
http://www.chtn.ims.nci.nih.gov

Cora Styles Needles 'N Blocks
56 Milton Street
Arlington, MA 02474
(781) 648-6289 FAX: (781) 641-7917

Coriell Cell Repository (CCR)
See Coriell Institute for Medical Research

Coriell Institute for Medical Research
Human Genetic Mutant Repository
401 Haddon Avenue
Camden, NJ 08103
(856) 966-7377 FAX: (856) 964-0254
http://arginine.umdnj.edu

Corion
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02038
(508) 528-4411 FAX: (508) 520-7583
(800) 598-6783
http://www.corion.com

Corning and Corning Science Products
P.O. Box 5000
Corning, NY 14831
(800) 222-7740 FAX: (607) 974-0345
(607) 974-9000
http://www.corning.com

Costar
See Corning

Coulbourn Instruments
7462 Penn Drive
Allentown, PA 18106
(800) 424-3771 FAX: (610) 391-1333
(610) 395-3771
http://www.coulbourninst.com

Coulter Cytometry
See Beckman Coulter

Covance Research Products
465 Swampbridge Road
Denver, PA 17517
(800) 345-4114 FAX: (717) 336-5344
(717) 336-4921
http://www.covance.com

Coy Laboratory Products
14500 Coy Drive
Grass Lake, MI 49240
(734) 475-2200 FAX: (734) 475-1846
http://www.coylab.com

CPG
3 Borinski Road
Lincoln Park, NJ 07035
(800) 362-2740 FAX: (973) 305-0884
(973) 305-8181
http://www.cpg-biotech.com

CPL Scientific
43 Kingfisher Court
Hambridge Road
Newbury RG14 5SJ, UK
(44) 1635-574902
FAX: (44) 1635-529322
http://www.cplscientific.co.uk

CraMar Technologies
8670 Wolff Court, #160
Westminster, CO 80030
(800) 4-TOMTEC
http://www.cramar.com

Crescent Chemical
1324 Motor Parkway
Hauppauge, NY 11788
(800) 877-3225 FAX: (631) 348-0913
(631) 348-0333
http://www.creschem.com

Crist Instrument
P.O. Box 128
10200 Moxley Road
Damascus, MD 20872
(301) 253-2184 FAX: (301) 253-0069
http://www.cristinstrument.com

Cruachem
See Annovis
http://www.cruachem.com

CS Bio
1300 Industrial Road
San Carlos, CA 94070
(800) 627-2461 FAX: (415) 802-0944
(415) 802-0880
http://www.csbio.com

CS-Chromatographie Service
Am Parir 27
D-52379 Langerwehe, Germany
(49) 2423-40493-0
FAX: (49) 2423-40493-49
http://www.cs-chromatographie.de

Cuno
400 Research Parkway
Meriden, CT 06450
(800) 231-2259 FAX: (203) 238-8716
(203) 237-5541
http://www.cuno.com

Curtin Matheson Scientific
9999 Veterans Memorial Drive
Houston, TX 77038
(800) 392-3353 FAX: (713) 878-3598
(713) 878-3500

CWE
124 Sibley Avenue
Ardmore, PA 19003
(610) 642-7719 FAX: (610) 642-1532
http://www.cwe-inc.com

Cybex Computer Products
4991 Corporate Drive
Huntsville, AL 35805
(800) 932-9239 FAX: (800) 462-9239
http://www.cybex.com

Cygnus Technology
P.O. Box 219
Delaware Water Gap, PA 18327
(570) 424-5701 FAX: (570) 424-5630
http://www.cygnustech.com

Cymbus Biotechnology
Eagle Class, Chandler's Ford
Hampshire SO53 4NF, UK
(44) 1-703-267-676
FAX: (44) 1-703-267-677
http://www.biotech@cymbus.com

Cytogen
600 College Road East
Princeton, NJ 08540
(609) 987-8200 FAX: (609) 987-6450
http://www.cytogen.com

Cytogen Research and Development
89 Bellevue Hill Road
Boston, MA 02132
(617) 325-7774 FAX: (617) 327-2405

CytRx
154 Technology Parkway
Norcross, GA 30092
(800) 345-2987 FAX: (770) 368-0622
(770) 368-9500
http://www.cytrx.com

Dade Behring
Corporate Headquarters
1717 Deerfield Road
Deerfield, IL 60015
(847) 267-5300 FAX: (847) 267-1066
http://www.dadebehring.com

Dagan
2855 Park Avenue
Minneapolis, MN 55407
(612) 827-5959 FAX: (612) 827-6535
http://www.dagan.com

Dako
6392 Via Real
Carpinteria, CA 93013
(800) 235-5763 FAX: (805) 566-6688
(805) 566-6655
http://www.dakousa.com

Dako A/S
42 Produktionsvej
P.O. Box 1359
DK-2600 Glostrup, Denmark
(45) 4492-0044 FAX: (45) 4284-1822

Dakopatts
See Dako A/S

Dalton Chemical Laboratoris
349 Wildcat Road
Toronto, Ontario
M3J 253 Canada
(416) 661-2102 FAX: (416) 661-2108
(800) 567-5060 (in Canada only)
http://www.dalton.com

Damon, IEC
See Thermoquest

Dan Kar Scientific
150 West Street
Wilmington, MA 01887
(800) 942-5542 FAX: (978) 658-0380
(978) 988-9696
http://www.dan-kar.com

DataCell
Falcon Business Park
40 Ivanhoe Road
Finchampstead, Berkshire
RG40 4QQ, UK
(44) 1189 324324
FAX: (44) 1189 324325
http://www.datacell.co.uk
In the US:
(408) 446-3575 FAX: (408) 446-3589
http://www.datacell.com

DataWave Technologies
380 Main Street, Suite 209
Longmont, CO 80501
(800) 736-9283　FAX: (303) 776-8531
(303) 776-8214

Datex-Ohmeda
3030 Ohmeda Drive
Madison, WI 53718
(800) 345-2700　FAX: (608) 222-9147
(608) 221-1551
http://www.us.datex-ohmeda.com

DATU
82 State Street
Geneva, NY 14456
(315) 787-2240　FAX: (315) 787-2397
http://www.nysaes.cornell.edu/datu

David Kopf Instruments
7324 Elmo Street
P.O. Box 636
Tujunga, CA 91043
(818) 352-3274　FAX: (818) 352-3139

Decagon Devices
P.O. Box 835
950 NE Nelson Court
Pullman, WA 99163
(800) 755-2751　FAX: (509) 332-5158
(509) 332-2756
http://www.decagon.com

Decon Labs
890 Country Line Road
Bryn Mawr, PA 19010
(800) 332-6647　FAX: (610) 964-0650
(610) 520-0610
http://www.deconlabs.com

Decon Laboratories
Conway Street
Hove, Sussex BN3 3LY, UK
(44) 1273 739241
FAX: (44) 1273 722088

Degussa
Precious Metals Division
3900 South Clinton Avenue
South Plainfield, NJ 07080
(800) DEGUSSA　FAX: (908) 756-7176
(908) 561-1100
http://www.degussa-huls.com

Deneba Software
1150 NW 72nd Avenue
Miami, FL 33126
(305) 596-5644　FAX: (305) 273-9069
http://www.deneba.com

Deseret Medical
524 West 3615 South
Salt Lake City, UT 84115
(801) 270-8440　FAX: (801) 293-9000

Devcon Plexus
30 Endicott Street
Danvers, MA 01923
(800) 626-7226　FAX: (978) 774-0516
(978) 777-1100
http://www.devcon.com

Developmental Studies Hybridoma Bank
University of Iowa
436 Biology Building
Iowa City, IA 52242
(319) 335-3826　FAX: (319) 335-2077
http://www.uiowa.edu/~dshbwww

DeVilbiss
Division of Sunrise Medical Respiratory
100 DeVilbiss Drive
P.O. Box 635
Somerset, PA 15501
(800) 338-1988　FAX: (814) 443-7572
(814) 443-4881
http://www.sunrisemedical.com

Dharmacon Research
1376 Miners Drive #101
Lafayette, CO 80026
(303) 604-9499　FAX: (303) 604-9680
http://www.dharmacom.com

DiaCheM
Triangle Biomedical
Gardiners Place
West Gillibrands, Lancashire
WN8 9SP, UK
(44) 1695-555581
FAX: (44) 1695-555518
http://www.diachem.co.uk

Diagen
Max-Volmer Strasse 4
D-40724 Hilden, Germany
(49) 2103-892-230
FAX: (49) 2103-892-222

Diagnostic Concepts
6104 Madison Court
Morton Grove, IL 60053
(847) 604-0957

Diagnostic Developments
See DiaCheM

Diagnostic Instruments
6540 Burroughs
Sterling Heights, MI 48314
(810) 731-6000　FAX: (810) 731-6469
http://www.diaginc.com

Diamedix
2140 North Miami Avenue
Miami, FL 33127
(800) 327-4565　FAX: (305) 324-2395
(305) 324-2300

DiaSorin
1990 Industrial Boulevard
Stillwater, MN 55082
(800) 328-1482　FAX: (651) 779-7847
(651) 439-9719
http://www.diasorin.com

Diatome US
321 Morris Road
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-5874　FAX: (215) 646-8931
(215) 646-1478
http://www.emsdiasum.com

Difco Laboratories
See Becton Dickinson

Digene
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878
(301) 944-7000 (800) 344-3631
FAX: (301) 944-7121
http://www.digene.com

Digi-Key
701 Brooks Avenue South
Thief River Falls, MN 56701
(800) 344-4539　FAX: (218) 681-3380
(218) 681-6674
http://www.digi-key.com

Digitimer
37 Hydeway
Welwyn Garden City, Hertfordshire
AL7 3BE, UK
(44) 1707-328347
FAX: (44) 1707-373153
http://www.digitimer.com

Dimco-Gray
8200 South Suburban Road
Dayton, OH 45458
(800) 876-8353　FAX: (937) 433-0520
(937) 433-7600
http://www.dimco-gray.com

Dionex
1228 Titan Way
P.O. Box 3603
Sunnyvale, CA 94088
(408) 737-0700　FAX: (408) 730-9403
http://dionex2.promptu.com

Display Systems Biotech
1260 Liberty Way, Suite B
Vista, CA 92083
(800) 697-1111　FAX: (760) 599-9930
(760) 599-0598
http://www.displaysystems.com

Diversified Biotech
1208 VFW Parkway
Boston, MA 02132
(617) 965-8557　FAX: (617) 323-5641
(800) 796-9199
http://www.divbio.com

DNA ProScan
P.O. Box 121585
Nashville, TN 37212
(800) 841-4362 FAX: (615) 292-1436
(615) 298-3524
http://www.dnapro.com

DNAStar
1228 South Park Street
Madison, WI 53715
(608) 258-7420 FAX: (608) 258-7439
http://www.dnastar.com

DNAVIEW
Attn: Charles Brenner
http://www.wco.com~cbrenner/dnaview.htm

Doall NYC
36-06 48th Avenue
Long Island City, NY 11101
(718) 392-4595 FAX: (718) 392-6115
http://www.doall.com

Dojindo Molecular Technologies
211 Perry Street Parkway, Suite 5
Gaitherbusburg, MD 20877
(877) 987-2667
http://www.dojindo.com

Dolla Eastern
See Doall NYC

Dolan Jenner Industries
678 Andover Street
Lawrence, MA 08143
(978) 681-8000 (978) 682-2500
http://www.dolan-jenner.com

Dow Chemical
Customer Service Center
2040 Willard H. Dow Center
Midland, MI 48674
(800) 232-2436 FAX: (517) 832-1190
(409) 238-9321
http://www.dow.com

Dow Corning
Northern Europe
Meriden Business Park
Copse Drive
Allesley, Coventry CV5 9RG, UK
(44) 1676 528 000
FAX: (44) 1676 528 001

Dow Corning
P.O. Box 994
Midland, MI 48686
(517) 496-4000
http://www.dowcorning.com

Dow Corning (Lubricants)
2200 West Salzburg Road
Auburn, MI 48611
(800) 248-2481 FAX: (517) 496-6974
(517) 496-6000

Dremel
4915 21st Street
Racine, WI 53406
(414) 554-1390
http://www.dremel.com

Drummond Scientific
500 Parkway
P.O. Box 700
Broomall, PA 19008
(800) 523-7480 FAX: (610) 353-6204
(610) 353-0200
http://www.drummondsci.com

Duchefa Biochemie BV
P.O. Box 2281
2002 CG Haarlem, The Netherlands
31-0-23-5319093
FAX: 31-0-23-5318027
http://www.duchefa.com

Duke Scientific
2463 Faber Place
Palo Alto, CA 94303
(800) 334-3883 FAX: (650) 424-1158
(650) 424-1177
http://www.dukescientific.com

Duke University Marine Laboratory
135 Duke Marine Lab Road
Beaufort, NC 28516-9721
(252) 504-7503 FAX: (252) 504-7648
http://www.env.duke.edu/marinelab

DuPont Biotechnology Systems
See NEN Life Science Products

DuPont Medical Products
See NEN Life Science Products

DuPont Merck Pharmaceuticals
331 Treble Cove Road
Billerica, MA 01862
(800) 225-1572 FAX: (508) 436-7501
http://www.dupontmerck.com

DuPont NEN Products
See NEN Life Science Products

Dynal
5 Delaware Drive
Lake Success, NY 11042
(800) 638-9416 FAX: (516) 326-3298
(516) 326-3270
http://www.dynal.net

Dynal AS
Ullernchausen 52,
0379 Oslo, Norway
47-22-06-10-00 FAX: 47-22-50-70-15
http://www.dynal.no

Dynalab
P.O. Box 112
Rochester, NY 14692
(800) 828-6595 FAX: (716) 334-9496
(716) 334-2060
http://www.dynalab.com

Dynarex
1 International Boulevard
Brewster, NY 10509
(888) DYNAREX FAX: (914) 279-9601
(914) 279-9600
http://www.dynarex.com

Dynatech
See Dynex Technologies

Dynex Technologies
14340 Sullyfield Circle
Chantilly, VA 22021
(800) 336-4543 FAX: (703) 631-7816
(703) 631-7800
http://www.dynextechnologies.com

Dyno Mill
See Willy A. Bachofen

E.S.A.
22 Alpha Road
Chelmsford, MA 01824
(508) 250-7000 FAX: (508) 250-7090

E.W. Wright
760 Durham Road
Guilford, CT 06437
(203) 453-6410 FAX: (203) 458-6901
http://www.ewwright.com

E-Y Laboratories
107 N. Amphlett Boulevard
San Mateo, CA 94401
(800) 821-0044 FAX: (650) 342-2648
(650) 342-3296
http://www.eylabs.com

Eastman Kodak
1001 Lee Road
Rochester, NY 14650
(800) 225-5352 FAX: (800) 879-4979
(716) 722-5780 FAX: (716) 477-8040
http://www.kodak.com

ECACC
See European Collection of Animal Cell Cultures

EC Apparatus
See Savant/EC Apparatus

Ecogen, SRL
Gensura Laboratories
Ptge. Dos de Maig
9(08041) Barcelona, Spain
(34) 3-450-2601 FAX: (34) 3-456-0607
http://www.ecogen.com

Ecolab
370 North Wabasha Street
St. Paul, MN 55102
(800) 35-CLEAN FAX: (651) 225-3098
(651) 352-5326
http://www.ecolab.com

ECO PHYSICS
3915 Research Park Drive, Suite A-3
Ann Arbor, MI 48108
(734) 998-1600 FAX: (734) 998-1180
http://www.ecophysics.com

Edge Biosystems
19208 Orbit Drive
Gaithersburg, MD 20879-4149
(800) 326-2685 FAX: (301) 990-0881
(301) 990-2685
http://www.edgebio.com

Edmund Scientific
101 E. Gloucester Pike
Barrington, NJ 08007
(800) 728-6999 FAX: (856) 573-6263
(856) 573-6250
http://www.edsci.com

EG&G
See Perkin-Elmer

Ekagen
969 C Industry Road
San Carlos, CA 94070
(650) 592-4500 FAX: (650) 592-4500

Elcatech
P.O. Box 10935
Winston-Salem, NC 27108
(336) 544-8613 FAX: (336) 777-3623
(910) 777-3624
http://www.elcatech.com

Electron Microscopy Sciences
321 Morris Road
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-5874 FAX: (215) 646-8931
(215) 646-1566
http://www.emsdiasum.com

Electron Tubes
100 Forge Way, Unit F
Rockaway, NJ 07866
(800) 521-8382 FAX: (973) 586-9771
(973) 586-9594
http://www.electrontubes.com

Elicay Laboratory Products, (UK) Ltd.
4 Manborough Mews
Crockford Lane
Basingstoke, Hampshire
RG 248NA, England
(256) 811-118 FAX: (256) 811-116
http://www.elkay-uk.co.uk

Eli Lilly
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285
(800) 545-5979 FAX: (317) 276-2095
(317) 276-2000
http://www.lilly.com

ELISA Technologies
See Neogen

Elkins-Sinn
See Wyeth-Ayerst

EMBI
See European Bioinformatics Institute

EM Science
480 Democrat Road
Gibbstown, NJ 08027
(800) 222-0342 FAX: (856) 423-4389
(856) 423-6300
http://www.emscience.com

EM Separations Technology
See R & S Technology

Endogen
30 Commerce Way
Woburn, MA 01801
(800) 487-4885 FAX: (617) 439-0355
(781) 937-0890
http://www.endogen.com

ENGEL-Loter
HSGM Heatcutting Equipment &
Machines
1865 E. Main Street, No. 5
Duncan, SC 29334
(888) 854-HSGM FAX: (864) 486-8383
(864) 486-8300
http://www.engelgmbh.com

Enzo Diagnostics
60 Executive Boulevard
Farmingdale, NY 11735
(800) 221-7705 FAX: (516) 694-7501
(516) 694-7070
http://www.enzo.com

Enzogenetics
4197 NW Douglas Avenue
Corvallis, OR 97330
(541) 757-0288

The Enzyme Center
See Charm Sciences

Enzyme Systems Products
486 Lindbergh Avenue
Livermore, CA 94550
(888) 449-2664 FAX: (925) 449-1866
(925) 449-2664
http://www.enzymesys.com

Epicentre Technologies
1402 Emil Street
Madison, WI 53713
(800) 284-8474 FAX: (608) 258-3088
(608) 258-3080
http://www.epicentre.com

Erie Scientific
20 Post Road
Portsmouth, NH 03801
(888) ERIE-SCI FAX: (603) 431-8996
(603) 431-8410
http://www.eriesci.com

ES Industries
701 South Route 73
West Berlin, NJ 08091
(800) 356-6140 FAX: (856) 753-8484
(856) 753-8400
http://www.esind.com

ESA
22 Alpha Road
Chelmsford, MA 01824
(800) 959-5095 FAX: (978) 250-7090
(978) 250-7000
http://www.esainc.com

Ethicon
Route 22, P.O. Box 151
Somerville, NJ 08876
(908) 218-0707
http://www.ethiconinc.com

Ethicon Endo-Surgery
4545 Creek Road
Cincinnati, OH 45242
(800) 766-9534 FAX: (513) 786-7080

Eurogentec
Parc Scientifique du Sart Tilman
4102 Seraing, Belgium
32-4-240-76-76 FAX: 32-4-264-07-88
http://www.eurogentec.com

European Bioinformatics Institute
Wellcome Trust Genomes Campus
Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK
(44) 1223-49444
FAX: (44) 1223-494468

European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)
Centre for Applied Microbiology &
Research
Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK
(44) 1980-612 512
FAX: (44) 1980-611 315
http://www.camr.org.uk

Evergreen Scientific
2254 E. 49th Street
P.O. Box 58248
Los Angeles, CA 90058
(800) 421-6261 FAX: (323) 581-2503
(323) 583-1331
http://www.evergreensci.com

Exalpha Biologicals
20 Hampden Street
Boston, MA 02205
(800) 395-1137 FAX: (617) 969-3872
(617) 558-3625
http://www.exalpha.com

Exciton
P.O. Box 31126
Dayton, OH 45437
(937) 252-2989 FAX: (937) 258-3937
http://www.exciton.com

Extrasynthese
ZI Lyon Nord
SA-BP62
69730 Genay, France
(33) 78-98-20-34
FAX: (33) 78-98-19-45

Factor II
1972 Forest Avenue
P.O. Box 1339
Lakeside, AZ 85929
(800) 332-8688　FAX: (520) 537-8066
(520) 537-8387
http://www.factor2.com

Falcon
See Becton Dickinson Labware

Febit AG
Kafertaler Strasse 190
D-68167 Mannheim
Germany
(49) 621-3804-0
FAX: (49) 621-3804-400
http://www.febit.com

Fenwal
See Baxter Healthcare

Filemaker
5201 Patrick Henry Drive
Santa Clara, CA 95054
(408) 987-7000 (800) 325-2747

Fine Science Tools
202-277 Mountain Highway
North Vancouver, British Columbia
V7J 3P2 Canada
(800) 665-5355　FAX: (800) 665 4544
(604) 980-2481　FAX: (604) 987-3299

Fine Science Tools
373-G Vintage Park Drive
Foster City, CA 94404
(800) 521-2109　FAX: (800) 523-2109
(650) 349-1636　FAX: (630) 349-3729

Fine Science Tools
Fahrtgasse 7-13
D-69117 Heidelberg, Germany
(49) 6221 905050
FAX: (49) 6221 600001
http://www.finescience.com

Finn Aqua
AMSCO Finn Aqua Oy
Teollisuustiez, FIN-04300
Tuusula, Finland
358 025851　FAX: 358 0276019

Finnigan
355 River Oaks Parkway
San Jose, CA 95134
(408) 433-4800　FAX: (408) 433-4821
http://www.finnigan.com

Dr. L. Fischer
Lutherstrasse 25A
D-69120 Heidelberg
Germany
(49) 6221-16-0368
http://home.eplus-online.de/
electroporation

Fisher Chemical Company
Fisher Scientific Limited
112 Colonnade Road
Nepean, Ontario K2E 7L6 Canada
(800) 234-7437　FAX: (800) 463-2996
http://www.fisherscientific.com

Fisher Scientific
2000 Park Lane
Pittsburgh, PA 15275
(800) 766-7000　FAX: (800) 926-1166
(412) 562-8300
http://www3.fishersci.com

W.F. Fisher & Son
220 Evans Way, Suite #1
Somerville, NJ 08876
(908) 707-4050　FAX: (908) 707-4099

Fitzco
5600 Pioneer Creek Drive
Maple Plain, MN 55359
(800) 367-8760　FAX: (612) 479-2880
(612) 479-3489
http://www.fitzco.com

5 Prime → 3 Prime
See 2000 Eppendorf-5 Prime
http://www.5prime.com

Flambeau
15981 Valplast Road
Middlefield, Ohio 44062
(800) 232-3474　FAX: (440) 632-1581
(440) 632-1631
http://www.flambeau.com

Fleisch (Rusch)
2450 Meadowbrook Parkway
Duluth, GA 30096
(770) 623-0816　FAX: (770) 623-1829
http://ruschinc.com

Flow Cytometry Standards
P.O. Box 194344
San Juan, PR 00919
(800) 227-8143　FAX: (787) 758-3267
(787) 753-9341
http://www.fcstd.com

Flow Labs
See ICN Biomedicals

Flow-Tech Supply
P.O. Box 1388
Orange, TX 77631
(409) 882-0306　FAX: (409) 882-0254
http://www.flow-tech.com

Fluid Marketing
See Fluid Metering

Fluid Metering
5 Aerial Way, Suite 500
Sayosett, NY 11791
(516) 922-6050　FAX: (516) 624-8261
http://www.fmipump.com

Fluorochrome
1801 Williams, Suite 300
Denver, CO 80264
(303) 394-1000　FAX: (303) 321-1119

Fluka Chemical
See Sigma-Aldrich

FMC BioPolymer
1735 Market Street
Philadelphia, PA 19103
(215) 299-6000　FAX: (215) 299-5809
http://www.fmc.com

FMC BioProducts
191 Thomaston Street
Rockland, ME 04841
(800) 521-0390　FAX: (800) 362-1133
(207) 594-3400　FAX: (207) 594-3426
http://www.bioproducts.com

Forma Scientific
Milcreek Road
P.O. Box 649
Marietta, OH 45750
(800) 848-3080　FAX: (740) 372-6770
(740) 373-4765
http://www.forma.com

Fort Dodge Animal Health
800 5th Street NW
Fort Dodge, IA 50501
(800) 685-5656　FAX: (515) 955-9193
(515) 955-4600
http://www.ahp.com

Fotodyne
950 Walnut Ridge Drive
Hartland, WI 53029
(800) 362-3686　FAX: (800) 362-3642
(262) 369-7000　FAX: (262) 369-7013
http://www.fotodyne.com

Fresenius HemoCare
6675 185th Avenue NE, Suite 100
Redwood, WA 98052
(800) 909-3872
(425) 497-1197
http://www.freseniusht.com

Fresenius Hemotechnology
See Fresenius HemoCare

Fuji Medical Systems
419 West Avenue
P.O. Box 120035
Stamford, CT 06902
(800) 431-1850　FAX: (203) 353-0926
(203) 324-2000
http://www.fujimed.com

Fujisawa USA
Parkway Center North
Deerfield, IL 60015-2548
(847) 317-1088　FAX: (847) 317-7298

Ernest F. Fullam
900 Albany Shaker Road
Latham, NY 12110
(800) 833-4024 FAX: (518) 785-8647
(518) 785-5533
http://www.fullam.com

Gallard-Schlesinger Industries
777 Zechendorf Boulevard
Garden City, NY 11530
(516) 229-4000 FAX: (516) 229-4015
http://www.gallard-schlessinger.com

Gambro
Box 7373
SE 103 91 Stockholm, Sweden
(46) 8 613 65 00
FAX: (46) 8 611 37 31
In the US: **COBE Laboratories**
225 Union Boulevard
Lakewood, CO 80215
(303) 232-6800 FAX: (303) 231-4915
http://www.gambro.com

Garner Glass
177 Indian Hill Boulevard
Claremont, CA 91711
(909) 624-5071 FAX: (909) 625-0173
http://www.garnerglass.com

Garon Plastics
16 Byre Avenue
Somerton Park, South Australia 5044
(08) 8294-5126 FAX: (08) 8376-1487
http://www.apache.airnet.com.au/~garon/

Garren Scientific
9400 Lurline Avenue, Unit E
Chatsworth, CA 91311
(800) 342-3725 FAX: (818) 882-3229
(818) 882-6544
http://www.garren-scientific.com

GATC Biotech AG
Jakob-Stadler-Platz 7
D-78467 Constance, Germany
(49) 07531-8160-0
FAX: (49) 07531-8160-81
http://www.gatc-biotech.com

Gaussian
Carnegie Office Park
Building 6, Suite 230
Carnegie, PA 15106
(412) 279-6700 FAX: (412) 279-2118
http://www.gaussian.com

G.C. Electronics/A.R.C. Electronics
431 Second Street
Henderson, KY 42420
(270) 827-8981 FAX: (270) 827-8256
http://www.arcelectronics.com

GDB (Genome Data Base, Curation)
2024 East Monument Street, Suite 1200
Baltimore, MD 21205
(410) 955-9705 FAX: (410) 614-0434
http://www.gdb.org

GDB (Genome Data Base, Home)
Hospital for Sick Children
555 University Avenue
Toronto, Ontario
M5G 1X8 Canada
(416) 813-8744 FAX: (416) 813-8755
http://www.gdb.org

Gelman Sciences
See Pall-Gelman

Gemini BioProducts
5115-M Douglas Fir Road
Calabasas, CA 90403
(818) 591-3530 FAX: (818) 591-7084

Gen Trak
5100 Campus Drive
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 221-7407 FAX: (215) 941-9498
(215) 825-5115
http://www.informagen.com

Genaissance Pharmaceuticals
5 Science Park
New Haven, CT 06511
(800) 678-9487 FAX: (203) 562-9377
(203) 773-1450
http://www.genaissance.com

GENAXIS Biotechnology
Parc Technologique
10 Avenue Ampere
Montigny le Bretoneux
78180 France
(33) 01-30-14-00-20
FAX: (33) 01-30-14-00-15
http://www.genaxis.com

GenBank
National Center for Biotechnology Information
National Library of Medicine/NIH
Building 38A, Room 8N805
8600 Rockville Pike
Bethesda, MD 20894
(301) 496-2475 FAX: (301) 480-9241
http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Gene Codes
640 Avis Drive
Ann Arbor, MI 48108
(800) 497-4939 FAX: (734) 930-0145
(734) 769-7249
http://www.genecodes.com

Genemachines
935 Washington Street
San Carlos, CA 94070
(650) 508-1634 FAX: (650) 508-1644
(877) 855-4363
http://www.genemachines.com

Genentech
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080
(800) 551-2231 FAX: (650) 225-1600
(650) 225-1000
http://www.gene.com

General Scanning/GSI Luminomics
500 Arsenal Street
Watertown, MA 02172
(617) 924-1010 FAX: (617) 924-7327
http://www.genescan.com

General Valve
Division of Parker Hannifin Pneutronics
19 Gloria Lane
Fairfield, NJ 07004
(800) GVC-VALV
FAX: (800) GVC-1-FAX
http://www.pneutronics.com

Genespan
19310 North Creek Parkway, Suite 100
Bothell, WA 98011
(800) 231-2215 FAX: (425) 482-3005
(425) 482-3003
http://www.genespan.com

Gene Therapy Systems
10190 Telesis Court
San Diego, CA 92122
(858) 457-1919 FAX: (858) 623-9494
http://www.genetherapysystems.com

Genethon Human Genome
Research Center
1 bis rue de l'Internationale
91000 Evry, France
(33) 169-472828
FAX: (33) 607-78698
http://www.genethon.fr

Genetic Microsystems
34 Commerce Way
Wobum, MA 01801
(781) 932-9333 FAX: (781) 932-9433
http://www.genticmicro.com

Genetic Mutant Repository
See Coriell Institute for Medical Research

Genetic Research Instrumentation
Gene House
Queenborough Lane
Rayne, Braintree, Essex CM7 8TF, UK
(44) 1376 332900
FAX: (44) 1376 344724
http://www.gri.co.uk

Genetics Computer Group
575 Science Drive
Madison, WI 53711
(608) 231-5200 FAX: (608) 231-5202
http://www.gcg.com

Genetics Institute/American Home Products
87 Cambridge Park Drive
Cambridge, MA 02140
(617) 876-1170 FAX: (617) 876-0388
http://www.genetics.com

Genetix
63-69 Somerford Road
Christchurch, Dorset BH23 3QA, UK
(44) (0) 1202 483900
FAX: (44)(0) 1202 480289
In the US: (877) 436 3849
US FAX: (888) 522 7499
http://www.genetix.co.uk

Gene Tools
One Summerton Way
Philomath, OR 97370
(541) 9292-7840
FAX: (541) 9292-7841
http://www.gene-tools.com

GeneWorks
P.O. Box 11, Rundle Mall
Adelaide, South Australia 5000, Australia
1800 882 555 FAX: (08) 8234 2699
(08) 8234 2644
http://www.geneworks.com

Genome Systems (INCYTE)
4633 World Parkway Circle
St. Louis, MO 63134
(800) 430-0030 FAX: (314) 427-3324
(314) 427-3222
http://www.genomesystems.com

Genomic Solutions
4355 Varsity Drive, Suite E
Ann Arbor, MI 48108
(877) GENOMIC FAX: (734) 975-4808
(734) 975-4800
http://www.genomicsolutions.com

Genomyx
See Beckman Coulter

Genosys Biotechnologies
1442 Lake Front Circle, Suite 185
The Woodlands, TX 77380
(281) 363-3693 FAX: (281) 363-2212
http://www.genosys.com

Genotech
92 Weldon Parkway
St. Louis, MO 63043
(800) 628-7730 FAX: (314) 991-1504
(314) 991-6034

GENSET
876 Prospect Street, Suite 206
La Jolla, CA 92037
(800) 551-5291 FAX: (619) 551-2041
(619) 515-3061
http://www.genset.fr

Gensia Laboratories Ltd.
19 Hughes
Irvine, CA 92718
(714) 455-4700 FAX: (714) 855-8210

Genta
99 Hayden Avenue, Suite 200
Lexington, MA 02421
(781) 860-5150 FAX: (781) 860-5137
http://www.genta.com

GENTEST
6 Henshaw Street
Woburn, MA 01801
(800) 334-5229 FAX: (888) 242-2226
(781) 935-5115 FAX: (781) 932-6855
http://www.gentest.com

Gentra Systems
15200 25th Avenue N., Suite 104
Minneapolis, MN 55447
(800) 866-3039 FAX: (612) 476-5850
(612) 476-5858
http://www.gentra.com

Genzyme
1 Kendall Square
Cambridge, MA 02139
(617) 252-7500 FAX: (617) 252-7600
http://www.genzyme.com
See also R&D Systems

Genzyme Genetics
One Mountain Road
Framingham, MA 01701
(800) 255-7357 FAX: (508) 872-9080
(508) 872-8400
http://www.genzyme.com

George Tiemann & Co.
25 Plant Avenue
Hauppauge, NY 11788
(516) 273-0005 FAX: (516) 273-6199

GIBCO/BRL
A Division of Life Technologies
1 Kendall Square
Grand Island, NY 14072
(800) 874-4226 FAX: (800) 352-1968
(716) 774-6700
http://www.lifetech.com

Gilmont Instruments
A Division of Barnant Company
28N092 Commercial Avenue
Barrington, IL 60010
(800) 637-3739 FAX: (708) 381-7053
http://barnant.com

Gilson
3000 West Beltline Highway
P.O. Box 620027
Middletown, WI 53562
(800) 445-7661
(608) 836-1551
http://www.gilson.com

Glas-Col Apparatus
P.O. Box 2128
Terre Haute, IN 47802
(800) Glas-Col FAX: (812) 234-6975
(812) 235-6167
http://www.glascol.com

Glaxo Wellcome
Five Moore Drive
Research Triangle Park, NC 27709
(800) SGL-AXO5 FAX: (919) 248-2386
(919) 248-2100
http://www.glaxowellcome.com

Glen Mills
395 Allwood Road
Clifton, NJ 07012
(973) 777-0777 FAX: (973) 777-0070
http://www.glenmills.com

Glen Research
22825 Davis Drive
Sterling, VA 20166
(800) 327-4536 FAX: (800) 934-2490
(703) 437-6191 FAX: (703) 435-9774
http://www.glenresearch.com

Glo Germ
P.O. Box 189
Moab, UT 84532
(800) 842-6622 FAX: (435) 259-5930
http://www.glogerm.com

Glyco
11 Pimentel Court
Novato, CA 94949
(800) 722-2597 FAX: (415) 382-3511
(415) 884-6799
http://www.glyco.com

Gould Instrument Systems
8333 Rockside Road
Valley View, OH 44125
(216) 328-7000 FAX: (216) 328-7400
http://www.gould13.com

Gralab Instruments
See Dimco-Gray

GraphPad Software
5755 Oberlin Drive #110
San Diego, CA 92121
(800) 388-4723 FAX: (558) 457-8141
(558) 457-3909
http://www.graphpad.com

Graseby Anderson
See Andersen Instruments
http://www.graseby.com

Grass Instrument
A Division of Astro-Med
600 East Greenwich Avenue
W. Warwick, RI 02893
(800) 225-5167 FAX: (877) 472-7749
http://www.grassinstruments.com

Greenacre and Misac Instruments
Misac Systems
27 Port Wood Road
Ware, Hertfordshire SF12 9NJ, UK
(44) 1920 463017
FAX: (44) 1920 465136

Greer Labs
639 Nuway Circle
Lenois, NC 28645
(704) 754-5237
http://greerlabs.com

Greiner
Maybachestrasse 2
Postfach 1162
D-7443 Frickenhausen, Germany
(49) 0 91 31/80 79 0
FAX: (49) 0 91 31/80 79 30
http://www.erlangen.com/greiner

GSI Lumonics
130 Lombard Street
Oxnard, CA 93030
(805) 485-5559 FAX: (805) 485-3310
http://www.gsilumonics.com

GTE Internetworking
150 Cambridge Park Drive
Cambridge, MA 02140
(800) 472-4565 FAX: (508) 694-4861
http://www.bbn.com

GW Instruments
35 Medford Street
Somerville, MA 02143
(617) 625-4096 FAX: (617) 625-1322
http://www.gwinst.com

H & H Woodworking
1002 Garfield Street
Denver, CO 80206
(303) 394-3764

Hacker Instruments
17 Sherwood Lane
P.O. Box 10033
Fairfield, NJ 07004
800-442-2537 FAX: (973) 808-8281
(973) 226-8450
http://www.hackerinstruments.com

Haemenetics
400 Wood Road
Braintree, MA 02184
(800) 225-5297 FAX: (781) 848-7921
(781) 848-7100
http://www.haemenetics.com

Halocarbon Products
P.O. Box 661
River Edge, NJ 07661
(201) 242-8899 FAX: (201) 262-0019
http://halocarbon.com

Hamamatsu Photonic Systems
A Division of Hamamatsu
360 Foothill Road
P.O. Box 6910
Bridgewater, NJ 08807
(908) 231-1116 FAX: (908) 231-0852
http://www.photonicsonline.com

Hamilton Company
4970 Energy Way
P.O. Box 10030
Reno, NV 89520
(800) 648-5950 FAX: (775) 856-7259
(775) 858-3000
http://www.hamiltoncompany.com

Hamilton-Kinder
http://www.hamiltonkinder.com/
(858) 679-1515 FAX: (858) 679-4811

Hamilton Thorne Biosciences
100 Cummings Center, Suite 102C
Beverly, MA 01915
http://www.hamiltonthorne.com

Hampton Research
27631 El Lazo Road
Laguna Niguel, CA 92677
(800) 452-3899 FAX: (949) 425-1611
(949) 425-6321
http://www.hamptonresearch.com

Harlan Bioproducts for Science
P.O. Box 29176
Indianapolis, IN 46229
(317) 894-7521 FAX: (317) 894-1840
http://www.hbps.com

Harlan Sera-Lab
Hillcrest, Dodgeford Lane
Belton, Loughborough
Leicester LE12 9TE, UK
(44) 1530 222123
FAX: (44) 1530 224970
http://www.harlan.com

Harlan Teklad
P.O. Box 44220
Madison, WI 53744
(608) 277-2070 FAX: (608) 277-2066
http://www.harlan.com

Harrick Scientific Corporation
88 Broadway
Ossining, NY 10562
(914) 762-0020 FAX: (914) 762-0914
http://www.harricksci.com

Harrison Research
840 Moana Court
Palo Alto, CA 94306
(650) 949-1565 FAX: (650) 948-0493

Harvard Apparatus
84 October Hill Road
Holliston, MA 01746
(800) 272-2775 FAX: (508) 429-5732
(508) 893-8999
http://harvardapparatus.com

Harvard Bioscience
See Harvard Apparatus

Haselton Biologics
See JRH Biosciences

Hazelton Research Products
See Covance Research Products

Health Products
See Pierce Chemical

Heat Systems-Ultrasonics
1938 New Highway
Farmingdale, NY 11735
(800) 645-9846 FAX: (516) 694-9412
(516) 694-9555

Heidenhain Corp
333 East State Parkway
Schaumberg, IL 60173
(847) 490-1191 FAX: (847) 490-3931
http://www.heidenhain.com

HEKA Instruments
33 Valley Rd.
Southboro, MA 01960
(866) 742-0606 FAX: (508) 481-8945
http://www.heka.com

Hellma Cells
11831 Queens Boulevard
Forest Hills, NY 11375
(718) 544-9166 FAX: (718) 263-6910
http://www.helmaUSA.com

Hellma
Postfach 1163
D-79371 Mullheim/Baden, Germany
(49) 7631-1820
FAX: (49) 7631-13546
http://www.hellma-worldwide.de

Henry Schein
135 Duryea Road, Mail Room 150
Melville, NY 11747
(800) 472-4346 FAX: (516) 843-5652
http://www.henryschein.com

Heraeus Kulzer
4315 South Lafayette Boulevard
South Bend, IN 46614
(800) 343-5336
(219) 291-0661
http://www.kulzer.com

Heraeus Sepatech
See Kendro Laboratory Products

Hercules Aqualon
Aqualon Division
Hercules Research Center, Bldg. 8145
500 Hercules Road
Wilmington, DE 19899
(800) 345-0447 FAX: (302) 995-4787
http://www.herc.com/aqualon/pharma

Heto-Holten A/S
Gydevang 17-19
DK-3450 Allerod, Denmark
(45) 48-16-62-00
FAX: (45) 48-16-62-97
Distributed by ATR

Hettich-Zentrifugen
See Andreas Hettich

Hewlett-Packard
3000 Hanover Street
Mailstop 20B3
Palo Alto, CA 94304
(650) 857-1501 FAX: (650) 857-5518
http://www.hp.com

HGS Hinimoto Plastics
1-10-24 Meguro-Honcho
Megurouko
Tokyo 152, Japan
3-3714-7226　FAX: 3-3714-4657

Hitachi Scientific Instruments
Nissei Sangyo America
8100 N. First Street
San Elsa, CA 95314
(800) 548-9001　FAX: (408) 432-0704
(408) 432-0520
http://www.hii.hitachi.com

Hi-Tech Scientific
Brunel Road
Salisbury, Wiltshire, SP2 7PU UK
(44) 1722-432320
(800) 344-0724 (US only)
http://www.hi-techsci.co.uk

Hoechst AG
See Aventis Pharmaceutical

Hoefer Scientific Instruments
Division of Amersham-Pharmacia
Biotech
800 Centennial Avenue
Piscataway, NJ 08855
(800) 227-4750　FAX: (877) 295-8102
http://www.apbiotech.com

Hoffman-LaRoche
340 Kingsland Street
Nutley, NJ 07110
(800) 526-0189　FAX: (973) 235-9605
(973) 235-5000
http://www.rocheUSA.com

Holborn Surgical and Medical Instruments
Westwood Industrial Estate
Ramsgate Road
Margate, Kent CT9 4JZ UK
(44) 1843 296666
FAX: (44) 1843 295446

Honeywell
101 Columbia Road
Morristown, NJ 07962
(973) 455-2000　FAX: (973) 455-4807
http://www.honeywell.com

Honeywell Specialty Films
P.O. Box 1039
101 Columbia Road
Morristown, NJ 07962
(800) 934-5679　FAX: (973) 455-6045
http://www.honeywell-specialtyfilms.com

Hood Thermo-Pad Canada
Comp. 20, Site 61A, RR2
Summerland, British Columbia
V0H 1Z0 Canada
(800) 665-9555　FAX: (250) 494-5003
(250) 494-5002
http://www.thermopad.com

Horiba Instruments
17671 Armstrong Avenue
Irvine, CA 92714
(949) 250-4811　FAX: (949) 250-0924
http://www.horiba.com

Hoskins Manufacturing
10776 Hall Road
P.O. Box 218
Hamburg, MI 48139
(810) 231-1900　FAX: (810) 231-4311
http://www.hoskinsmfgco.com

Hosokawa Micron Powder Systems
10 Chatham Road
Summit, NJ 07901
(800) 526-4491　FAX: (908) 273-7432
(908) 273-6360
http://www.hosokawamicron.com

HT Biotechnology
Unit 4
61 Ditton Walk
Cambridge CB5 8QD, UK
(44) 1223-412583

Hugo Sachs Electronik
Postfach 138
7806 March-Hugstetten, Germany
D-79229(49) 7665-92000
FAX: (49) 7665-920090

Human Biologics International
7150 East Camelback Road, Suite 245
Scottsdale, AZ 85251
(480) 990-2005　FAX: (480)-990-2155
http://www.humanbiological.com

Human Genetic Mutant Cell Repository
See Coriell Institute for Medical Research

HVS Image
P.O. Box 100
Hampton, Middlesex TW12 2YD, UK
FAX: (44) 208 783 1223
In the US: (800) 225-9261
FAX: (888) 483-8033
http://www.hvsimage.com

Hybaid
111-113 Waldegrave Road
Teddington, Middlesex TW11 8LL, UK
(44) 0 1784 42500
FAX: (44) 0 1784 248085
http://www.hybaid.co.uk

Hybaid Instruments
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02028
(888)4-HYBAID　FAX: (508) 541-3041
(508) 541-6918
http://www.hybaid.com

Hybridon
155 Fortune Boulevard
Milford, MA 01757
(508) 482-7500　FAX: (508) 482-7510
http://www.hybridon.com

HyClone Laboratories
1725 South HyClone Road
Logan, UT 84321
(800) HYCLONE　FAX: (800) 533-9450
(801) 753-4584　FAX: (801) 750-0809
http://www.hyclone.com

Hyseq
670 Almanor Avenue
Sunnyvale, CA 94086
(408) 524-8100　FAX: (408) 524-8141
http://www.hyseq.com

IBA GmbH
1508 South Grand Blvd.
St. Louis, MO 63104
(877) 422-4624　FAX: (888) 531-6813
http://www.iba-go.com

IBF Biotechnics
See Sepracor

IBI (International Biotechnologies)
See Eastman Kodak
For technical service (800) 243-2555
(203) 786-5600

ICN Biochemicals
See ICN Biomedicals

ICN Biomedicals
3300 Hyland Avenue
Costa Mesa, CA 92626
(800) 854-0530　FAX: (800) 334-6999
(714) 545-0100　FAX: (714) 641-7275
http://www.icnbiomed.com

ICN Flow and Pharmaceuticals
See ICN Biomedicals

ICN Immunobiochemicals
See ICN Biomedicals

ICN Radiochemicals
See ICN Biomedicals

ICONIX
100 King Street West, Suite 3825
Toronto, Ontario
M5X 1E3 Canada
(416) 410-2411　FAX: (416) 368-3089
http://www.iconix.com

ICRT (Imperial Cancer Research Technology)
Sardinia House
Sardinia Street
London WC2A 3NL, UK
(44) 1712-421136
FAX: (44) 1718-314991

Idea Scientific Company
P.O. Box 13210
Minneapolis, MN 55414
(800) 433-2535　FAX: (612) 331-4217
http://www.ideascientific.com

IEC
See International Equipment Co.

IITC
23924 Victory Boulevard
Woodland Hills, CA 91367
(888) 414-4482 (818) 710-1556
FAX: (818) 992-5185
http://www.iitcinc.com

IKA Works
2635 N. Chase Parkway, SE
Wilmington, NC 28405
(910) 452-7059 FAX: (910) 452-7693
http://www.ika.net

Ikegami Electronics
37 Brook Avenue
Maywood, NJ 07607
(201) 368-9171 FAX: (201) 569-1626

Ikemoto Scientific Technology
25-11 Hongo
3-chome, Bunkyo-ku
Tokyo 101-0025, Japan
(81) 3-3811-4181
FAX: (81) 3-3811-1960

Imagenetics
See ATC Diagnostics

Imaging Research
c/o Brock University
500 Glenridge Avenue
St. Catharines, Ontario
L2S 3A1 Canada
(905) 688-2040 FAX: (905) 685-5861
http://www.imaging.brocku.ca

Imclone Systems
180 Varick Street
New York, NY 10014
(212) 645-1405 FAX: (212) 645-2054
http://www.imclone.com

IMCO Corporation LTD., AB
P.O. Box 21195
SE-100 31
Stockholm, Sweden
46-8-33-53-09 FAX: 46-8-728-47-76
http://www.imcocorp.se

Imgenex Corporation
11175 Flintkote Avenue
Suite E
San Diego, CA 92121
(888) 723-4363 FAX: (858) 642-0937
(858) 642.0978
http://www.imgenex.com

IMICO
Calle Vivero, No. 5-4a Planta
E-28040, Madrid, Spain
(34) 1-535-3960 FAX: (34) 1-535-2780

Immunex
51 University Street
Seattle, WA 98101
(206) 587-0430 FAX: (206) 587-0606
http://www.immunex.com

Immunocorp
1582 W. Deere Avenue
Suite C
Irvine, CA 92606
(800) 446-3063
http://www.immunocorp.com

Immunotech
130, av. Delattre de Tassigny
B.P. 177
13276 Marseilles Cedex 9
France
(33) 491-17-27-00
FAX: (33) 491-41-43-58
http://www.immunotech.fr

Imperial Chemical Industries
Imperial Chemical House
Millbank, London SW1P 3JF, UK
(44) 171-834-4444
FAX: (44)171-834-2042
http://www.ici.com

Inceltech
See New Brunswick Scientific

Incstar
See DiaSorin

Incyte
6519 Dumbarton Circle
Fremont, CA 94555
(510) 739-2100 FAX: (510) 739-2200
http://www.incyte.com

Incyte Pharmaceuticals
3160 Porter Drive
Palo Alto, CA 94304
(877) 746-2983 FAX: (650) 855-0572
(650) 855-0555
http://www.incyte.com

Individual Monitoring Systems
6310 Harford Road
Baltimore, MD 21214

Indo Fine Chemical
P.O. Box 473
Somerville, NJ 08876
(888) 463-6346 FAX: (908) 359-1179
(908) 359-6778
http://www.indofinechemical.com

Industrial Acoustics
1160 Commerce Avenue
Bronx, NY 10462
(718) 931-8000 FAX: (718) 863-1138
http://www.industrialacoustics.com

Inex Pharmaceuticals
100-8900 Glenlyon Parkway
Glenlyon Business Park
Burnaby, British Columbia
V5J 5J8 Canada
(604) 419-3200 FAX: (604) 419-3201
http://www.inexpharm.com

Ingold, Mettler, Toledo
261 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(800) 352-8763 FAX: (978) 658-0020
(978) 658-7615
http://www.mt.com

Innogenetics N.V.
Technologie Park 6
B-9052 Zwijnaarde
Belgium
(32) 9-329-1329 FAX: (32) 9-245-7623
http://www.innogenetics.com

Innovative Medical Services
1725 Gillespie Way
El Cajon, CA 92020
(619) 596-8600 FAX: (619) 596-8700
http://www.imspure.com

Innovative Research
3025 Harbor Lane N, Suite 300
Plymouth, MN 55447
(612) 519-0105 FAX: (612) 519-0239
http://www.inres.com

Innovative Research of America
2 N. Tamiami Trail, Suite 404
Sarasota, FL 34236
(800) 421-8171 FAX: (800) 643-4345
(941) 365-1406 FAX: (941) 365-1703
http://www.innovrsrch.com

Inotech Biosystems
15713 Crabbs Branch Way, #110
Rockville, MD 20855
(800) 635-4070 FAX: (301) 670-2859
(301) 670-2850
http://www.inotechintl.com

INOVISION
22699 Old Canal Road
Yorba Linda, CA 92887
(714) 998-9600 FAX: (714) 998-9666
http://www.inovision.com

Instech Laboratories
5209 Militia Hill Road
Plymouth Meeting, PA 19462
(800) 443-4227 FAX: (610) 941-0134
(610) 941-0132
http://www.instechlabs.com

Instron
100 Royall Street
Canton, MA 02021
(800) 564-8378 FAX: (781) 575-5725
(781) 575-5000
http://www.instron.com

Instrumentarium
P.O. Box 300
00031 Instrumentarium
Helsinki, Finland
(10) 394-5566
http://www.instrumentarium.fi

Instruments SA
Division Jobin Yvon
16-18 Rue du Canal
91165 Longjumeau, Cedex, France
(33)1 6454-1300
FAX: (33)1 6909-9319
http://www.isainc.com

Instrutech
20 Vanderventer Avenue, Suite 101E
Port Washington, NY 11050
(516) 883-1300 FAX: (516) 883-1558
http://www.instrutech.com

Integrated DNA Technologies
1710 Commercial Park
Coralville, IA 52241
(800) 328-2661 FAX: (319) 626-8444
http://www.idtdna.com

Integrated Genetics
See Genzyme Genetics

Integrated Scientific Imaging Systems
3463 State Street, Suite 431
Santa Barbara, CA 93105
(805) 692-2390 FAX: (805) 692-2391
http://www.imagingsystems.com

Integrated Separation Systems (ISS)
See OWL Separation Systems

IntelliGenetics
See Oxford Molecular Group

Interactiva BioTechnologie
Sedanstrasse 10
D-89077 Ulm, Germany
(49) 731-93579-290
FAX: (49) 731-93579-291
http://www.interactiva.de

Interchim
213 J.F. Kennedy Avenue
B.P. 1140
Montlucon
03103 France
(33) 04-70-03-83-55
FAX: (33) 04-70-03-93-60

Interfocus
14/15 Spring Rise
Falcover Road
Haverhill, Suffolk CB9 7XU, UK
(44) 1440 703460
FAX: (44) 1440 704397
http://www.interfocus.ltd.uk

Intergen
2 Manhattanville Road
Purchase, NY 10577
(800) 431-4505 FAX: (800) 468-7436
(914) 694-1700 FAX: (914) 694-1429
http://www.intergenco.com

Intermountain Scientific
420 N. Keys Drive
Kaysville, UT 84037
(800) 999-2901 FAX: (800) 574-7892
(801) 547-5047 FAX: (801) 547-5051
http://www.bioexpress.com

International Biotechnologies (IBI)
See Eastman Kodak

International Equipment Co. (IEC)
See Thermoquest

International Institute for the
Advancement of Medicine
1232 Mid-Valley Drive
Jessup, PA 18434
(800) 486-IIAM FAX: (570) 343-6993
(570) 496-3400
http://www.iiam.org

International Light
17 Graf Road
Newburyport, MA 01950
(978) 465-5923 FAX: (978) 462-0759

International Market Supply (I.M.S.)
Dane Mill
Broadhurst Lane
Congleton, Cheshire CW12 1LA, UK
(44) 1260 275469
FAX: (44) 1260 276007

International Marketing Services
See International Marketing Ventures

International Marketing Ventures
6301 Ivy Lane, Suite 408
Greenbelt, MD 20770
(800) 373-0096 FAX: (301) 345-0631
(301) 345-2866
http://www.imvlimited.com

International Products
201 Connecticut Drive
Burlington, NJ 08016
(609) 386-8770 FAX: (609) 386-8438
http://www.mkt@ipcol.com

Intracel Corporation
Bartels Division
2005 Sammamish Road, Suite 107
Issaquah, WA 98027
(800) 542-2281 FAX: (425) 557-1894
(425) 392-2992
http://www.intracel.com

Invitrogen
1600 Faraday Avenue
Carlsbad, CA 92008
(800) 955-6288 FAX: (760) 603-7201
(760) 603-7200
http://www.invitrogen.com

In Vivo Metric
P.O. Box 249
Healdsburg, CA 95448
(707) 433-4819 FAX: (707) 433-2407

IRORI
9640 Towne Center Drive
San Diego, CA 92121
(858) 546-1300 FAX: (858) 546-3083
http://www.irori.com

Irvine Scientific
2511 Daimler Street
Santa Ana, CA 92705
(800) 577-6097 FAX: (949) 261-6522
(949) 261-7800
http://www.irvinesci.com

ISC BioExpress
420 North Kays Drive
Kaysville, UT 84037
(800) 999-2901 FAX: (800) 574-7892
(801) 547-5047
http://www.bioexpress.com

ISCO
P.O. Box 5347
4700 Superior
Lincoln, NE 68505
(800) 228-4373 FAX: (402) 464-0318
(402) 464-0231
http://www.isco.com

Isis Pharmaceuticals
Carlsbad Research Center
2292 Faraday Avenue
Carlsbad, CA 92008
(760) 931-9200
http://www.isip.com

Isolabs
See Wallac

ISS
See Integrated Separation Systems

J & W Scientific
See Agilent Technologies

J.A. Webster
86 Leominster Road
Sterling, MA 01564
(800) 225-7911 FAX: (978) 422-8959
http://www.jawebster.com

J.T. Baker
See Mallinckrodt Baker
222 Red School Lane
Phillipsburg, NJ 08865
(800) JTBAKER FAX: (908) 859-6974
http://www.jtbaker.com

Jackson ImmunoResearch
Laboratories
P.O. Box 9
872 W. Baltimore Pike
West Grove, PA 19390
(800) 367-5296 FAX: (610) 869-0171
(610) 869-4024
http://www.jacksonimmuno.com

The Jackson Laboratory
600 Maine Street
Bar Harbor, ME 04059
(800) 422-6423 FAX: (207) 288-5079
(207) 288-6000
http://www.jax.org

Jaece Industries
908 Niagara Falls Boulevard
North Tonawanda, NY 14120
(716) 694-2811　FAX: (716) 694-2811
http://www.jaece.com

Jandel Scientific
See SPSS

Janke & Kunkel
See Ika Works

Janssen Life Sciences Products
See Amersham

Janssen Pharmaceutica
1125 Trenton-Harbourton Road
Titusville, NJ 09560
(609) 730-2577　FAX: (609) 730-2116
http://us.janssen.com

Jasco
8649 Commerce Drive
Easton, MD 21601
(800) 333-5272　FAX: (410) 822-7526
(410) 822-1220
http://www.jascoinc.com

Jena Bioscience
Loebstedter Str. 78
07749 Jena, Germany
(49) 3641-464920
FAX: (49) 3641-464991
http://www.jenabioscience.com

Jencons Scientific
800 Bursca Drive, Suite 801
Bridgeville, PA 15017
(800) 846-9959　FAX: (412) 257-8809
(412) 257-8861
http://www.jencons.co.uk

JEOL Instruments
11 Dearborn Road
Peabody, MA 01960
(978) 535-5900　FAX: (978) 536-2205
http://www.jeol.com/index.html

Jewett
750 Grant Street
Buffalo, NY 14213
(800) 879-7767　FAX: (716) 881-6092
(716) 881-0030
http://www.JewettInc.com

John's Scientific
See VWR Scientific

John Weiss and Sons
95 Alston Drive
Bradwell Abbey
Milton Keynes, Buckinghamshire
MK1 4HF UK
(44) 1908-318017
FAX: (44) 1908-318708

Johnson & Johnson Medical
2500 Arbrook Boulevard East
Arlington, TX 76004
(800) 423-4018
http://www.jnjmedical.com

Johnston Matthey Chemicals
Orchard Road
Royston, Hertfordshire SG8 5HE, UK
(44) 1763-253000
FAX: (44) 1763-253466
http://www.chemicals.matthey.com

Jolley Consulting and Research
683 E. Center Street, Unit H
Grayslake, IL 60030
(847) 548-2330　FAX: (847) 548-2984
http://www.jolley.com

Jordan Scientific
See Shelton Scientific

Jorgensen Laboratories
1450 N. Van Buren Avenue
Loveland, CO 80538
(800) 525-5614　FAX: (970) 663-5042
(970) 669-2500
http://www.jorvet.com

JRH Biosciences and JR Scientific
13804 W. 107th Street
Lenexa, KS 66215
(800) 231-3735　FAX: (913) 469-5584
(913) 469-5580

Jule Bio Technologies
25 Science Park, #14, Suite 695
New Haven, CT 06511
(800) 648-1772　FAX: (203) 786-5489
(203) 786-5490
http://hometown.aol.com/precastgel/index.htm

K.R. Anderson
2800 Bowers Avenue
Santa Clara, CA 95051
(800) 538-8712　FAX: (408) 727-2959
(408) 727-2800
http://www.kranderson.com

Kabi Pharmacia Diagnostics
See Pharmacia Diagnostics

Kanthal H.P. Reid
1 Commerce Boulevard
P.O. Box 352440
Palm Coast, FL 32135
(904) 445-2000　FAX: (904) 446-2244
http://www.kanthal.com

Kapak
5305 Parkdale Drive
St. Louis Park, MN 55416
(800) KAPAK-57　FAX: (612) 541-0735
(612) 541-0730
http://www.kapak.com

Karl Hecht
Stettener Str. 22-24
D-97647 Sondheim
Rhon, Germany
(49) 9779-8080　FAX: (49) 9779-80888

Karl Storz
Koningin-Elisabeth Str. 60
D-14059 Berlin, Germany
(49) 30-30 69 09-0
FAX: (49) 30-30 19 452
http://www.karlstorz.de

KaVo EWL
P.O. Box 1320
D-88293 Leutkirch im Allgau, Germany
(49) 7561-86-0　FAX: (49) 7561-86-371
http://www.kavo.com/english/startseite.htm

Keithley Instruments
28775 Aurora Road
Cleveland, OH 44139
(800) 552-1115　FAX: (440) 248-6168
(440) 248-0400
http://www.keithley.com

Kemin
2100 Maury Street, Box 70
Des Moines, IA 50301
(515) 266-2111　FAX: (515) 266-8354
http://www.kemin.com

Kemo
3 Brook Court, Blakeney Road
Beckenham, Kent BR3 1HG, UK
(44) 0181 658 3838
FAX: (44) 0181 658 4084
http://www.kemo.com

Kendall
15 Hampshire Street
Mansfield, MA 02048
(800) 962-9888　FAX: (800) 724-1324
http://www.kendallhq.com

Kendro Laboratory Products
31 Pecks Lane
Newtown, CT 06470
(800) 522-SPIN　FAX: (203) 270-2166
(203) 270-2080
http://www.kendro.com

Kendro Laboratory Products
P.O. Box 1220
Am Kalkberg
D-3360 Osterod, Germany
(55) 22-316-213
FAX: (55) 22-316-202
http://www.heraeus-instruments.de

Kent Laboratories
23404 NE 8th Street
Redmond, WA 98053
(425) 868-6200　FAX: (425) 868-6335
http://www.kentlabs.com

Kent Scientific
457 Bantam Road, #16
Litchfield, CT 06759
(888) 572-8887　FAX: (860) 567-4201
(860) 567-5496
http://www.kentscientific.com

Keuffel & Esser
See Azon

Keystone Scientific
Penn Eagle Industrial Park
320 Rolling Ridge Drive
Bellefonte, PA 16823
(800) 437-2999 FAX: (814) 353-2305
(814) 353-2300 Ext 1
http://www.keystonescientific.com

Kimble/Kontes Biotechnology
1022 Spruce Street
P.O. Box 729
Vineland, NJ 08360
(888) 546-2531 FAX: (856) 794-9762
(856) 692-3600
http://www.kimble-kontes.com

Kinematica AG
Luzernerstrasse 147a
CH-6014 Littau-Luzern, Switzerland
(41) 41 2501257
FAX: (41) 41 2501460
http://www.kinematica.ch

Kin-Tek
504 Laurel Street
LaMarque, TX 77568
(800) 326-3627
FAX: (409) 938-3710
http://www.kin-tek.com

Kipp & Zonen
125 Wilbur Place
Bohemia, NY 11716
(800) 645-2065 FAX: (516) 589-2068
(516) 589-2885
http://www.kippzonen.thomasregister.com/olc/kippzonen

Kirkegaard & Perry Laboratories
2 Cessna Court
Gaithersburg, MD 20879
(800) 638-3167 FAX: (301) 948-0169
(301) 948-7755
http://www.kpl.com

Kodak
See Eastman Kodak

Kontes Glass
See Kimble/Kontes Biotechnology

Kontron Instruments AG
Postfach CH-8010
Zurich, Switzerland
41-1-733-5733 FAX: 41-1-733-5734

David Kopf Instruments
P.O. Box 636
Tujunga, CA 91043
(818) 352-3274 FAX: (818) 352-3139

Kraft Apparatus
See Glas-Col Apparatus

Kramer Scientific Corporation
711 Executive Boulevard
Valley Cottage, NY 10989
(845) 267-5050 FAX: (845) 267-5550

Kulite Semiconductor Products
1 Willow Tree Road
Leonia, NJ 07605
(201) 461-0900 FAX: (201) 461-0990
http://www.kulite.com

Lab-Line Instruments
15th & Bloomingdale Avenues
Melrose Park, IL 60160
(800) LAB-LINE FAX: (708) 450-5830
FAX: (800) 450-4LAB
http://www.labline.com

Lab Products
742 Sussex Avenue
P.O. Box 639
Seaford, DE 19973
(800) 526-0469 FAX: (302) 628-4309
(302) 628-4300
http://www.labproductsinc.com

LabRepco
101 Witmer Road, Suite 700
Horsham, PA 19044
(800) 521-0754 FAX: (215) 442-9202
http://www.labrepco.com

Lab Safety Supply
P.O. Box 1368
Janesville, WI 53547
(800) 356-0783 FAX: (800) 543-9910
(608) 754-7160 FAX: (608) 754-1806
http://www.labsafety.com

Lab-Tek Products
See Nalge Nunc International

Labconco
8811 Prospect Avenue
Kansas City, MO 64132
(800) 821-5525 FAX: (816) 363-0130
(816) 333-8811
http://www.labconco.com

Labindustries
See Barnstead/Thermolyne

Labnet International
P.O. Box 841
Woodbridge, NJ 07095
(888) LAB-NET1 FAX: (732) 417-1750
(732) 417-0700
http://www.nationallabnet.com

LABO-MODERNE
37 rue Dombasle
Paris
75015 France
(33) 01-45-32-62-54
FAX: (33) 01-45-32-01-09
http://www.labomoderne.com/fr

Laboratory of Immunoregulation
National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH
9000 Rockville Pike
Building 10, Room 11B13
Bethesda, MD 20892
(301) 496-1124

Laboratory Supplies
29 Jefry Lane
Hicksville, NY 11801
(516) 681-7711

Labscan Limited
Stillorgan Industrial Park
Stillorgan
Dublin, Ireland
(353) 1-295-2684
FAX: (353) 1-295-2685
http://www.labscan.ie

Labsystems
See Thermo Labsystems

Labsystems Affinity Sensors
Saxon Way, Bar Hill
Cambridge CB3 8SL, UK
44 (0) 1954 789976
FAX: 44 (0) 1954 789417
http://www.affinity-sensors.com

Labtronics
546 Governors Road
Guelph, Ontario
N1K 1E3 Canada
(519) 763-4930 FAX: (519) 836-4431
http://www.labtronics.com

Labtronix Manufacturing
3200 Investment Boulevard
Hayward, CA 94545
(510) 786-3200 FAX: (510) 786-3268
http://www.labtronix.com

Lafayette Instrument
3700 Sagamore Parkway North
P.O. Box 5729
Lafayette, IN 47903
(800) 428-7545 FAX: (765) 423-4111
(765) 423-1505
http://www.lafayetteinstrument.com

Lambert Instruments
Turfweg 4
9313 TH Leutingewolde
The Netherlands
(31) 50-5018461
FAX: (31) 50-5010034
http://www.lambert-instruments.com

Lampire Biological Laboratories
P.O. Box 270
Pipersville, PA 18947
(215) 795-2538 FAX: (215) 795-0237
http://www.lampire.com

Lancaster Synthesis
P.O. Box 1000
Windham, NH 03087
(800) 238-2324 FAX: (603) 889-3326
(603) 889-3306
http://www.lancastersynthesis-us.com

Lancer
140 State Road 419
Winter Springs, FL 32708
(800) 332-1855 FAX: (407) 327-1229
(407) 327-8488
http://www.lancer.com

LaVision GmbH
Gerhard-Gerdes-Str. 3
D-37079
Goettingen, Germany
(49) 551-50549-0
FAX: (49) 551-50549-11
http://www.lavision.de

Lawshe
See Advanced Process Supply

Laxotan
20, rue Leon Blum
26000 Valence, France
(33) 4-75-41-91-91
FAX: (33) 4-75-41-91-99
http://www.latoxan.com

LC Laboratories
165 New Boston Street
Woburn, MA 01801
(781) 937-0777 FAX: (781) 938-5420
http://www.lclaboratories.com

LC Packings
80 Carolina Street
San Francisco, CA 94103
(415) 552-1855 FAX: (415) 552-1859
http://www.lcpackings.com

LC Services
See LC Laboratories

LECO
3000 Lakeview Avenue
St. Joseph, MI 49085
(800) 292-6141 FAX: (616) 982-8977
(616) 985-5496
http://www.leco.com

Lederle Laboratories
See Wyeth-Ayerst

Lee Biomolecular Research
Laboratories
11211 Sorrento Valley Road, Suite M
San Diego, CA 92121
(858) 452-7700

The Lee Company
2 Pettipaug Road
P.O. Box 424
Westbrook, CT 06498
(800) LEE-PLUG FAX: (860) 399-7058
(860) 399-6281
http://www.theleeco.com

Lee Laboratories
1475 Athens Highway
Grayson, GA 30017
(800) 732-9150 FAX: (770) 979-9570
(770) 972-4450
http://www.leelabs.com

Leica
111 Deer Lake Road
Deerfield, IL 60015
(800) 248-0123 FAX: (847) 405-0147
(847) 405-0123
http://www.leica.com

Leica Microsystems
Imneuenheimer Feld 518
D-69120
Heidelberg, Germany
(49) 6221-41480
FAX: (49) 6221-414833
http://www.leica-microsystems.com

Leinco Technologies
359 Consort Drive
St. Louis, MO 63011
(314) 230-9477 FAX: (314) 527-5545
http://www.leinco.com

Leitz U.S.A.
See Leica

LenderKing Metal Products
8370 Jumpers Hole Road
Millersville, MD 21108
(410) 544-8795 FAX: (410) 544-5069
http://www.lenderking.com

Letica Scientific Instruments
Panlab s.i., c/Loreto 50
08029 Barcelona, Spain
(34) 93-419-0709
FAX: (34) 93-419-7145
http://www.panlab-sl.com

Leybold-Heraeus Trivac DZA
5700 Mellon Road
Export, PA 15632
(412) 327-5700

LI-COR
Biotechnology Division
4308 Progressive Avenue
Lincoln, NE 68504
(800) 645-4267 FAX: (402) 467-0819
(402) 467-0700
http://www.licor.com

Life Science Laboratories
See Adaptive Biosystems

Life Science Resources
Two Corporate Center Drive
Melville, NY 11747
(800) 747-9530 FAX: (516) 844-5114
(516) 844-5085
http://www.astrocam.com

Life Sciences
2900 72nd Street North
St. Petersburg, FL 33710
(800) 237-4323 FAX: (727) 347-2957
(727) 345-9371
http://www.lifesci.com

Life Technologies
9800 Medical Center Drive
P.O. Box 6482
Rockville, MD 20849
(800) 828-6686 FAX: (800) 331-2286
http://www.lifetech.com

Lifecodes
550 West Avenue
Stamford, CT 06902
(800) 543-3263 FAX: (203) 328-9599
(203) 328-9500
http://www.lifecodes.com

Lightnin
135 Mt. Read Boulevard
Rochester, NY 14611
(888) MIX-BEST FAX: (716) 527-1742
(716) 436-5550
http://www.lightnin-mixers.com

Linear Drives
Luckyn Lane, Pipps Hill
Basildon, Essex SS14 3BW, UK
(44) 1268-287070
FAX: (44) 1268-293344
http://www.lineardrives.com

Linscott's Directory
4877 Grange Road
Santa Rosa, CA 95404
(707) 544-9555 FAX: (415) 389-6025
http://www.linscottsdirectory.co.uk

Linton Instrumentation
Unit 11, Forge Business Center
Upper Rose Lane
Palgrave, Diss, Norfolk IP22 1AP, UK
(44) 1-379-651-344
FAX: (44) 1-379-650-970
http://www.lintoninst.co.uk

List Biological Laboratories
501-B Vandell Way
Campbell, CA 95008
(800) 726-3213 FAX: (408) 866-6364
(408) 866-6363
http://www.listlabs.com

LKB Instruments
See Amersham Pharmacia Biotech

Lloyd Laboratories
604 West Thomas Avenue
Shenandoah, IA 51601
(800) 831-0004 FAX: (712) 246-5245
(712) 246-4000
http://www.lloydinc.com

Loctite
1001 Trout Brook Crossing
Rocky Hill, CT 06067
(860) 571-5100 FAX: (860)571-5465
http://www.loctite.com

Lofstrand Labs
7961 Cessna Avenue
Gaithersburg, MD 20879
(800) 541-0362　FAX: (301) 948-9214
(301) 330-0111
http://www.lofstrand.com

Lomir Biochemical
99 East Main Street
Malone, NY 12953
(877) 425-3604　FAX: (518) 483-8195
(518) 483-7697
http://www.lomir.com

LSL Biolafitte
10 rue de Temara
7810C St.-Germain-en-Laye, France
(33) 1-3061-5260
FAX: (33) 1-3061-5234

Ludl Electronic Products
171 Brady Avenue
Hawthorne, NY 10532
(888) 769-6111　FAX: (914) 769-4759
(914) 769-6111
http://www.ludl.com

Lumigen
24485 W. Ten Mile Road
Southfield, MI 48034
(248) 351-5600　FAX: (248) 351-0518
http://www.lumigen.com

Luminex
12212 Technology Boulevard
Austin, TX 78727
(888) 219-8020　FAX: (512) 258-4173
(512) 219-8020
http://www.luminexcorp.com

LYNX Therapeutics
25861 Industrial Boulevard
Hayward, CA 94545
(510) 670-9300　FAX: (510) 670-9302
http://www.lynxgen.com

Lyphomed
3 Parkway North
Deerfield, IL 60015
(847) 317-8100　FAX: (847) 317-8600

M.E.D. Associates
See Med Associates

Macherey-Nagel
6 South Third Street, #402
Easton, PA 18042
(610) 559-9848　FAX: (610) 559-9878
http://www.macherey-nagel.com

Macherey-Nagel
Valencienner Strasse 11
P.O. Box 101352
D-52313 Dueren, Germany
(49) 2421-969141
FAX: (49) 2421-969199
http://www.macherey-nagel.ch

Mac-Mod Analytical
127 Commons Court
Chadds Ford, PA 19317
800-441-7508　FAX: (610) 358-5993
(610) 358-9696
http://www.mac-mod.com

Mallinckrodt Baker
222 Red School Lane
Phillipsburg, NJ 08865
(800) 582-2537　FAX: (908) 859-6974
(908) 859-2151
http://www.mallbaker.com

Mallinckrodt Chemicals
16305 Swingley Ridge Drive
Chesterfield, MD 63017
(314) 530-2172　FAX: (314) 530-2563
http://www.mallchem.com

Malven Instruments
Enigma Business Park
Grovewood Road
Malven, Worchestershire
WR 141 XZ, United Kingdom

Marinus
1500 Pier C Street
Long Beach, CA 90813
(562) 435-6522　FAX: (562) 495-3120

Markson Science
c/o Whatman Labs Sales
P.O. Box 1359
Hillsboro, OR 97123
(800) 942-8626　FAX: (503) 640-9716
(503) 648-0762

Marsh Biomedical Products
565 Blossom Road
Rochester, NY 14610
(800) 445-2812　FAX: (716) 654-4810
(716) 654-4800
http://www.biomar.com

Marshall Farms USA
5800 Lake Bluff Road
North Rose, NY 14516
(315) 587-2295
e-mail: info@marfarms.com

Martek
6480 Dobbin Road
Columbia, MD 21045
(410) 740-0081　FAX: (410) 740-2985
http://www.martekbio.com

Martin Supply
Distributor of Gerber Scientific
2740 Loch Raven Road
Baltimore, MD 21218
(800) 282-5440　FAX: (410) 366-0134
(410) 366-1696

Mast Immunosystems
630 Clyde Court
Mountain View, CA 94043
(800) 233-MAST　FAX: (650) 969-2745
(650) 961-5501
http://www.mastallergy.com

Matheson Gas Products
P.O. Box 624
959 Route 46 East
Parsippany, NJ 07054
(800) 416-2505　FAX: (973) 257-9393
(973) 257-1100
http://www.mathesongas.com

Mathsoft
1700 Westlake Avenue N., Suite 500
Seattle, WA 98109
(800) 569-0123　FAX: (206) 283-8691
(206) 283-8802
http://www.mathsoft.com

Matreya
500 Tressler Street
Pleasant Gap, PA 16823
(814) 359-5060　FAX: (814) 359-5062
http://www.matreya.com

Matrigel
See Becton Dickinson Labware

Matrix Technologies
22 Friars Drive
Hudson, NH 03051
(800) 345-0206　FAX: (603) 595-0106
(603) 595-0505
http://www.matrixtechcorp.com

MatTek Corp.
200 Homer Avenue
Ashland, MA 01721
(508) 881-6771　FAX: (508) 879-1532
http://www.mattek.com

Maxim Medical
89 Oxford Road
Oxford OX2 9PD
United Kingdom
44 (0)1865-865943
FAX: 44 (0)1865-865291
http://www.maximmed.com

Mayo Clinic
Section on Engineering
Project #ALA-1, 1982
200 1st Street SW
Rochester, MN 55905
(507) 284-2511　FAX: (507) 284-5988

McGaw
See B. Braun-McGaw

McMaster-Carr
600 County Line Road
Elmhurst, IL 60126
(630) 833-0300　FAX: (630) 834-9427
http://www.mcmaster.com

McNeil Pharmaceutical
See Ortho McNeil Pharmaceutical

MCNC
3021 Cornwallis Road
P.O. Box 12889
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 248-1800　FAX: (919) 248-1455
http://www.mcnc.org

MD Industries
5 Revere Drive, Suite 415
Northbrook, IL 60062
(800) 421-8370 FAX: (847) 498-2627
(708) 339-6000
http://www.mdindustries.com

MDS Nordion
447 March Road
P.O. Box 13500
Kanata, Ontario
K2K 1X8 Canada
(800) 465-3666 FAX: (613) 592-6937
(613) 592-2790
http://www.mds.nordion.com

MDS Sciex
71 Four Valley Drive
Concord, Ontario
Canada L4K 4V8
(905) 660-9005 FAX: (905) 660-2600
http://www.sciex.com

Mead Johnson
See Bristol-Meyers Squibb

Med Associates
P.O. Box 319
St. Albans, VT 05478
(802) 527-2343 FAX: (802) 527-5095
http://www.med-associates.com

Medecell
239 Liverpool Road
London N1 1LX, UK
(44) 20-7607-2295
FAX: (44) 20-7700-4156
http://www.medicell.co.uk

Media Cybernetics
8484 Georgia Avenue, Suite 200
Silver Spring, MD 20910
(301) 495-3305 FAX: (301) 495-5964
http://www.mediacy.com

Mediatech
13884 Park Center Road
Herndon, VA 20171
(800) cellgro
(703) 471-5955
http://www.cellgro.com

Medical Systems
See Harvard Apparatus

Medifor
647 Washington Street
Port Townsend, WA 98368
(800) 366-3710 FAX: (360) 385-4402
(360) 385-0722
http://www.medifor.com

MedImmune
35 W. Watkins Mill Road
Gaithersburg, MD 20878
(301) 417-0770 FAX: (301) 527-4207
http://www.medimmune.com

MedProbe AS
P.O. Box 2640
St. Hanshaugen
N-0131 Oslo, Norway
(47) 222 00137 FAX: (47) 222 00189
http://www.medprobe.com

Megazyme
Bray Business Park
Bray, County Wicklow
Ireland
(353) 1-286-1220
FAX: (353) 1-286-1264
http://www.megazyme.com

Melles Griot
4601 Nautilus Court South
Boulder, CO 80301
(800) 326-4363 FAX: (303) 581-0960
(303) 581-0337
http://www.mellesgriot.com

Menzel-Glaser
Postfach 3157
D-38021 Braunschweig, Germany
(49) 531 590080
FAX: (49) 531 509799

E. Merck
Frankfurterstrasse 250
D-64293 Darmstadt 1, Germany
(49) 6151-720

Merck
See EM Science

Merck & Company
Merck National Service Center
P.O. Box 4
West Point, PA 19486
(800) NSC-MERCK
(215) 652-5000
http://www.merck.com

Merck Research Laboratories
See Merck & Company

Merck Sharpe Human Health Division
300 Franklin Square Drive
Somerset, NJ 08873
(800) 637-2579 FAX: (732) 805-3960
(732) 805-0300

Merial Limited
115 Transtech Drive
Athens, GA 30601
(800) MERIAL-1 FAX: (706) 548-0608
(706) 548-9292
http://www.merial.com

Meridian Instruments
P.O. Box 1204
Kent, WA 98035
(253) 854-9914 FAX: (253) 854-9902
http://www.minstrument.com

Meta Systems Group
32 Hammond Road
Belmont, MA 02178
(617) 489-9950 FAX: (617) 489-9952

Metachem Technologies
3547 Voyager Street, Bldg. 102
Torrance, CA 90503
(310) 793-2300 FAX: (310) 793-2304
http://www.metachem.com

Metallhantering
Box 47172
100-74 Stockholm, Sweden
(46) 8-726-9696

MethylGene
7220 Frederick-Banting, Suite 200
Montreal, Quebec
H4S 2A1 Canada
http://www.methylgene.com

Metro Scientific
475 Main Street, Suite 2A
Farmingdale, NY 11735
(800) 788-6247 FAX: (516) 293-8549
(516) 293-9656

Metrowerks
980 Metric Boulevard
Austin, TX 78758
(800) 377-5416
(512) 997-4700
http://www.metrowerks.com

Mettler Instruments
Mettler-Toledo
1900 Polaris Parkway
Columbus, OH 43240
(800) METTLER FAX: (614) 438-4900
http://www.mt.com

Miami Serpentarium Labs
34879 Washington Loop Road
Punta Gorda, FL 33982
(800) 248-5050 FAX: (813) 639-1811
(813) 639-8888
http://www.miamiserpentarium.com

Michrom BioResources
1945 Industrial Drive
Auburn, CA 95603
(530) 888-6498 FAX: (530) 888-8295
http://www.michrom.com

Mickle Laboratory Engineering
Gomshall, Surrey, UK
(44) 1483-202178

Micra Scientific
A division of Eichrom Industries
8205 S. Cass Ave, Suite 111
Darien, IL 60561
(800) 283-4752 FAX: (630) 963-1928
(630) 963-0320
http://www.micrasci.com

MicroBrightField
74 Hegman Avenue
Colchester, VT 05446
(802) 655-9360 FAX: (802) 655-5245
http://www.microbrightfield.com

Micro Essential Laboratory
4224 Avenue H
Brooklyn, NY 11210
(718) 338-3618 FAX: (718) 692-4491

Micro Filtration Systems
7-3-Chome, Honcho
Nihonbashi, Tokyo, Japan
(81) 3-270-3141

Micro-Metrics
P.O. Box 13804
Atlanta, GA 30324
(770) 986-6015 FAX: (770) 986-9510
http://www.micro-metrics.com

Micro-Tech Scientific
140 South Wolfe Road
Sunnyvale, CA 94086
(408) 730-8324 FAX: (408) 730-3566
http://www.microlc.com

Microbix Biosystems
341 Bering Avenue
Toronto, Ontario
M8Z 3A8 Canada
1-800-794-6694 FAX: 416-234-1626
1-416-234-1624
http://www.microbix.com

MicroCal
22 Industrial Drive East
Northampton, MA 01060
(800) 633-3115 FAX: (413) 586-0149
(413) 586-7720
http://www.microcalorimetry.com

Microfluidics
30 Ossipee Road
P.O. Box 9101
Newton, MA 02164
(800) 370-5452 FAX: (617) 965-1213
(617) 969-5452
http://www.microfluidicscorp.com

Microgon
See Spectrum Laboratories

Microlase Optical Systems
West of Scotland Science Park
Kelvin Campus, Maryhill Road
Glasgow G20 0SP, UK
(44) 141-948-1000
FAX: (44) 141-946-6311
http://www.microlase.co.uk

Micron Instruments
4509 Runway Street
Simi Valley, CA 93063
(800) 638-3770 FAX: (805) 522-4982
(805) 552-4676
http://www.microninstruments.com

Micron Separations
See MSI

Micro Photonics
4949 Liberty Lane, Suite 170
P.O. Box 3129
Allentown, PA 18106
(610) 366-7103 FAX: (610) 366-7105
http://www.microphotonics.com

MicroTech
1420 Conchester Highway
Boothwyn, PA 19061
(610) 459-3514

Midland Certified Reagent Company
3112-A West Cuthbert Avenue
Midland, TX 79701
(800) 247-8766 FAX: (800) 359-5789
(915) 694-7950 FAX: (915) 694-2387
http://www.mcrc.com

Midwest Scientific
280 Vance Road
Valley Park, MO 63088
(800) 227-9997 FAX: (636) 225-9998
(636) 225-9997
http://www.midsci.com

Miles
See Bayer

Miles Laboratories
See Serological

Miles Scientific
See Nunc

Millar Instruments
P.O. Box 230227
6001-A Gulf Freeway
Houston, TX 77023
(713) 923-9171 FAX: (713) 923-7757
http://www.millarinstruments.com

MilliGen/Biosearch
See Millipore

Millipore
80 Ashbury Road
P.O. Box 9125
Bedford, MA 01730
(800) 645-5476 FAX: (781) 533-3110
(781) 533-6000
http://www.millipore.com

Miltenyi Biotec
251 Auburn Ravine Road, Suite 208
Auburn, CA 95603
(800) 367-6227 FAX: (530) 888-8925
(530) 888-8871
http://www.miltenyibiotec.com

Miltex
6 Ohio Drive
Lake Success, NY 11042
(800) 645-8000 FAX: (516) 775-7185
(516) 349-0001

Milton Roy
See Spectronic Instruments

Mimotopes
Suite F
4178 Sorrento Valley Boulevard
San Diego, CA 92121
(858) 558-5800 (800) 644-1866
Fax: (858) 558-5810 (800) 655-1866
http://www.mimotopes.com

Mini-Instruments
15 Burnham Business Park
Springfield Road
Burnham-on-Crouch, Essex CM0 8TE, UK
(44) 1621-783282
FAX: (44) 1621-783132
http://www.mini-instruments.co.uk

Mini Mitter
P.O. Box 3386
Sunriver, OR 97707
(800) 685-2999 FAX: (541) 593-5604
(541) 593-8639
http://www.minimitter.com

Mirus Corporation
505 S. Rosa Road
Suite 104
Madison, WI 53719
(608) 441-2852 FAX: (608) 441-2849
http://www.genetransfer.com

Misonix
1938 New Highway
Farmingdale, NY 11735
(800) 645-9846 FAX: (516) 694-9412
http://www.misonix.com

Mitutoyo (MTI)
See Dolla Eastern

MJ Research
Waltham, MA 02451
(800) PELTIER FAX: (617) 923-8080
(617) 923-8000
http://www.mjr.com

Modular Instruments
228 West Gay Street
Westchester, PA 19380
(610) 738-1420 FAX: (610) 738-1421
http://www.mi2.com

Molecular Biology Insights
8685 US Highway 24
Cascade, CO 80809-1333
(800) 747-4362 FAX: (719) 684-7989
(719) 684-7988
http://www.oligo.net

Molecular Biosystems
10030 Barnes Canyon Road
San Diego, CA 92121
(858) 452-0681 FAX: (858) 452-6187
http://www.mobi.com

Molecular Devices
1312 Crossman Avenue
Sunnyvale, CA 94089
(800) 635-5577 FAX: (408) 747-3602
(408) 747-1700
http://www.moldev.com

Molecular Designs
1400 Catalina Street
San Leandro, CA 94577
(510) 895-1313 FAX: (510) 614-3608

Molecular Dynamics
928 East Arques Avenue
Sunnyvale, CA 94086
(800) 333-5703 FAX: (408) 773-1493
(408) 773-1222
http://www.apbiotech.com

Molecular Probes
4849 Pitchford Avenue
Eugene, OR 97402
(800) 438-2209 FAX: (800) 438-0228
(541) 465-8300 FAX: (541) 344-6504
http://www.probes.com

Molecular Research Center
5645 Montgomery Road
Cincinnati, OH 45212
(800) 462-9868 FAX: (513) 841-0080
(513) 841-0900
http://www.mrcgene.com

Molecular Simulations
9685 Scranton Road
San Diego, CA 92121
(800) 756-4674 FAX: (858) 458-0136
(858) 458-9990
http://www.msi.com

Monoject Disposable Syringes & Needles/Syrvet
16200 Walnut Street
Waukee, IA 50263
(800) 727-5203 FAX: (515) 987-5553
(515) 987-5554
http://www.syrvet.com

Monsanto Chemical
800 North Lindbergh Boulevard
St. Louis, MO 63167
(314) 694-1000 FAX: (314) 694-7625
http://www.monsanto.com

Moravek Biochemicals
577 Mercury Lane
Brea, CA 92821
(800) 447-0100 FAX: (714) 990-1824
(714) 990-2018
http://www.moravek.com

Moss
P.O. Box 189
Pasadena, MD 21122
(800) 932-6677 FAX: (410) 768-3971
(410) 768-3442
http://www.mosssubstrates.com

Motion Analysis
3617 Westwind Boulevard
Santa Rosa, CA 95403
(707) 579-6500 FAX: (707) 526-0629
http://www.motionanalysis.com

Mott
Farmington Industrial Park
84 Spring Lane
Farmington, CT 06032
(860) 747-6333 FAX: (860) 747-6739
http://www.mottcorp.com

MSI (Micron Separations)
See Osmonics

MTX Lab Systems
8456 Tyco Road
Building D
Vienna, VA 22182
(800) 848-6474 Fax: (703) 821-1046
(703) 821-1045

Multi Channel Systems
Markwiesenstrasse 55
72770 Reutlingen, Germany
(49) 7121-503010
FAX: (49) 7121-503011
http://www.multichannelsystems.com

Multiple Peptide Systems
3550 General Atomics Court
San Diego, CA 92121
(800) 338-4965 FAX: (800) 654-5592
(858) 455-3710 FAX: (858) 455-3713
http://www.mps-sd.com

Murex Biotech Limited
Central Road
Temple Hill, Dartford
Kent DA1 5LR UK
(44) 1322-277-711
Fax: (44) 1322-273-288
http://www.abbott-murex.com

Murex Diagnostics
3075 Northwoods Circle
Norcross, GA 30071
(707) 662-0660 FAX: (770) 447-4989

MWG-Biotech
Anzinger Str. 7
D-85560 Ebersberg, Germany
(49) 8092-82890
FAX: (49) 8092-21084
http://www.mwgbiotech.com

Myriad Industries
3454 E Street
San Diego, CA 92102
(800) 999-6777 FAX: (619) 232-4819
(619) 232-6700
http://www.myriadindustries.com

Nacalai Tesque
Nijo Karasuma, Nakagyo-ku
Kyoto 604, Japan
81-75-251-1723
FAX: 81-75-251-1762
http://www.nacalai.co.jp

Nalge Nunc International
Subsidiary of Sybron International
75 Panorama Creek Drive
P.O. Box 20365
Rochester, NY 14602
(800) 625-4327 FAX: (716) 586-8987
(716) 264-9346
http://www.nalgenunc.com

Nanogen
10398 Pacific Center Court
San Diego, CA 92121
(858) 410-4600 FAX: (858) 410-4848
http://www.nanogen.com

Nanoprobes
95 Horse Block Road
Yaphank, NY 11980
(877) 447-6266 FAX: (631) 205-9493
(631) 205-9490
http://www.nanoprobes.com

Narishige USA
1710 Hempstead Turnpike
East Meadow, NY 11554
(800) 445-7914 FAX: (516) 794-0066
(516) 794-8000
http://www.narishige.co.jp

Nasco-Fort Atkinson
P.O. Box 901
901 Janesville Ave.
Fort Atkinson, WI 53538-0901
(800) 558-9595 FAX: (920) 563-8296
http://www.enasco.com

National Bag Company
2233 Old Mill Road
Hudson, OH 44236
(800) 247-6000 FAX: (330) 425-9800
(330) 425-2600
http://www.nationalbag.com

National Band and Tag
Department X 35, Box 72430
Newport, KY 41032
(606) 261-2035 FAX: (800) 261-8247
https://www.nationalband.com

National Biosciences
See Molecular Biology Insights

National Diagnostics
305 Patton Drive
Atlanta, GA 30336
(800) 526-3867 FAX: (404) 699-2077
(404) 699-2121
http://www.nationaldiagnostics.com

National Disease Research Exchange
1880 John F. Kennedy Blvd., 11th Fl.
Philadelphia, PA 19103
(800) 222-6374
http://www.ndri.com

National Institute of Standards and Technology
100 Bureau Drive
Gaithersburg, MD 20899
(301) 975-NIST FAX: (301) 926-1630
http://www.nist.gov

National Instruments
11500 North Mopac Expressway
Austin, TX 78759
(512) 794-0100 FAX: (512) 683-8411
http://www.ni.com

National Labnet
See Labnet International

National Scientific Instruments
975 Progress Circle
Lawrenceville, GA 300243
(800) 332-3331 FAX: (404) 339-7173
http://www.nationalscientific.com

National Scientific Supply
1111 Francisco Bouldvard East
San Rafael, CA 94901
(800) 525-1779 FAX: (415) 459-2954
(415) 459-6070
http://www.nat-sci.com

Naz-Dar-KC Chicago
Nazdar
1087 N. North Branch Street
Chicago, IL 60622
(800) 736-7636 FAX: (312) 943-8215
(312) 943-8338
http://www.nazdar.com

NB Labs
1918 Avenue A
Denison, TX 75021
(903) 465-2694 FAX: (903) 463-5905
http://www.nblabslarry.com

NEB
See New England Biolabs

NEN Life Science Products
549 Albany Street
Boston, MA 02118
(800) 551-2121 FAX: (617) 451-8185
(617) 350-9075
http://www.nen.com

NEN Research Products, Dupont (UK)
Diagnostics and Biotechnology Systems
Wedgewood Way
Stevenage, Hertfordshire SG1 4QN, UK
44-1438-734831
44-1438-734000
FAX: 44-1438-734836
http://www.dupont.com

Neogen
628 Winchester Road
Lexington, KY 40505
(800) 477-8201 FAX: (606) 255-5532
(606) 254-1221
http://www.neogen.com

Neosystems
380, 11012 Macleod Trail South
Calgary, Alberta
T2J 6A5 Canada
(403) 225-9022 FAX: (403) 225-9025
http://www.neosystems.com

Neuralynx
2434 North Pantano Road
Tucson, AZ 85715
(520) 722-8144 FAX: (520) 722-8163
http://www.neuralynx.com

Neuro Probe
16008 Industrial Drive
Gaithersburg, MD 20877
(301) 417-0014 FAX: (301) 977-5711
http://www.neuroprobe.com

Neurocrine Biosciences
10555 Science Center Drive
San Diego, CA 92121
(619) 658-7600 FAX: (619) 658-7602
http://www.neurocrine.com

Nevtek
HCR03, Box 99
Burnsville, VA 24487
(540) 925-2322 FAX: (540) 925-2323
http://www.nevtek.com

New Brunswick Scientific
44 Talmadge Road
Edison, NJ 08818
(800) 631-5417 FAX: (732) 287-4222
(732) 287-1200
http://www.nbsc.com

New England Biolabs (NEB)
32 Tozer Road
Beverly, MA 01915
(800) 632-5227 FAX: (800) 632-7440
http://www.neb.com

New England Nuclear (NEN)
See NEN Life Science Products

New MBR
Gubelstrasse 48
CH8050 Zurich, Switzerland
(41) 1-313-0703

Newark Electronics
4801 N. Ravenswood Avenue
Chicago, IL 60640
(800) 4-NEWARK FAX: (773) 907-5339
(773) 784-5100
http://www.newark.com

Newell Rubbermaid
29 E. Stephenson Street
Freeport, IL 61032
(815) 235-4171 FAX: (815) 233-8060
http://www.newellco.com

Newport Biosystems
1860 Trainor Street
Red Bluff, CA 96080
(530) 529-2448 FAX: (530) 529-2648

Newport
1791 Deere Avenue
Irvine, CA 92606
(800) 222-6440 FAX: (949) 253-1800
(949) 253-1462
http://www.newport.com

Nexin Research B.V.
P.O. Box 16
4740 AA Hoeven, The Netherlands
(31) 165-503172
FAX: (31) 165-502291

NIAID
See Bio-Tech Research Laboratories

Nichiryo
230 Route 206
Building 2-2C
Flanders, NJ 07836
(877) 548-6667 FAX: (973) 927-0099
(973) 927-4001
http://www.nichiryo.com

Nichols Institute Diagnostics
33051 Calle Aviador
San Juan Capistrano, CA 92675
(800) 286-4NID FAX: (949) 240-5273
(949) 728-4610
http://www.nicholsdiag.com

Nichols Scientific Instruments
3334 Brown Station Road
Columbia, MO 65202
(573) 474-5522 FAX: (603) 215-7274
http://home.beseen.com
technology/nsitechnology

Nicolet Biomedical Instruments
5225 Verona Road, Building 2
Madison, WI 53711
(800) 356-0007 FAX: (608) 441-2002
(608) 273-5000
http://nicoletbiomedical.com

N.I.G.M.S. (National Institute of General Medical Sciences)
See Coriell Institute for Medical Research

Nikon
Science and Technologies Group
1300 Walt Whitman Road
Melville, NY 11747
(516) 547-8500 FAX: (516) 547-4045
http://www.nikonusa.com

Nippon Gene
1-29, Ton-ya-machi
Toyama 930, Japan
(81) 764-51-6548
FAX: (81) 764-51-6547

Noldus Information Technology
751 Miller Drive
Suite E-5
Leesburg, VA 20175
(800) 355-9541 FAX: (703) 771-0441
(703) 771-0440
http://www.noldus.com

Nordion International
See MDS Nordion

North American Biologicals (NABI)
16500 NW 15th Avenue
Miami, FL 33169
(800) 327-7106 (305) 625-5305
http://www.nabi.com

North American Reiss
See Reiss

Northwestern Bottle
24 Walpole Park South
Walpole, MA 02081
(508) 668-8600　FAX: (508) 668-7790

NOVA Biomedical
Nova Biomedical 200
Prospect Street Waltham, MA 02454
(800) 822-0911　FAX: (781) 894-5915
http://www.novabiomedical.com

Novagen
601 Science Drive
Madison, WI 53711
(800) 526-7319　FAX: (608) 238-1388
(608) 238-6110
http://www.novagen.com

Novartis
59 Route 10
East Hanover, NJ 07936
(800)526-0175　FAX: (973) 781-6356
http://www.novartis.com

Novartis Biotechnology
3054 Cornwallis Road
Research Triangle Park, NC 27709
(888) 462-7288　FAX: (919) 541-8585
http://www.novartis.com

Nova Sina AG
Subsidiary of Airflow Lufttechnik GmbH
Kleine Heeg 21
52259 Rheinbach, Germany
(49) 02226 920-0
FAX: (49) 02226 9205-11

Novex/Invitrogen
1600 Faraday
Carlsbad, CA 92008
(800) 955-6288　FAX: (760) 603-7201
http://www.novex.com

Novo Nordisk Biochem
77 Perry Chapel Church Road
Franklington, NC 27525
(800) 879-6686　FAX: (919) 494-3450
(919) 494-3000
http://www.novo.dk

Novo Nordisk BioLabs
See Novo Nordisk Biochem

Novocastra Labs
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle-upon-Tyne
Tyne and Wear NE12 8EW, UK
(44) 191-215-0567
FAX: (44) 191-215-1152
http://www.novocastra.co.uk

Novus Biologicals
P.O. Box 802
Littleton, CO 80160
(888) 506-6887　FAX: (303) 730-1966
http://www.novus-biologicals.com/main.html

NPI Electronic
Hauptstrasse 96
D-71732 Tamm, Germany
(49) 7141-601534
FAX: (49) 7141-601266
http://www.npielectronic.com

NSG Precision Cells
195G Central Avenue
Farmingdale, NY 11735
(516) 249-7474　FAX: (516) 249-8575
http://www.nsgpci.com

Nu Chek Prep
109 West Main
P.O. Box 295
Elysian, MN 56028
(800) 521-7728　FAX: (507) 267-4790
(507) 267-4689

Nuclepore
See Costar

Numonics
101 Commerce Drive
Montgomeryville, PA 18936
(800) 523-6716　FAX: (215) 361-0167
(215) 362-2766
http://www.interactivewhiteboards.com

NYCOMED AS Pharma
c/o Accurate Chemical & Scientific
300 Shames Drive
Westbury, NY 11590
(800) 645-6524　FAX: (516) 997-4948
(516) 333-2221
http://www.accuratechemical.com

Nycomed Amersham
Health Care Division
101 Carnegie Center
Princeton, NJ 08540
(800) 832-4633　FAX: (800) 807-2382
(609) 514-6000
http://www.nycomed-amersham.com

Nyegaard
Herserudsvagen 5254
S-122 06 Lidingo, Sweden
(46) 8-765-2930

Ohmeda Catheter Products
See Datex-Ohmeda

Ohwa Tsusbo
Hiby Dai Building
1-2-2 Uchi Saiwai-cho
Chiyoda-ku
Tokyo 100, Japan
03-3591-7348　FAX: 03-3501-9001

Oligos Etc.
9775 S.W. Commerce Circle, C-6
Wilsonville, OR 97070
(800) 888-2358
FAX: (503) 6822D1635
(503) 6822D1814
http://www.oligoetc.com

Olis Instruments
130 Conway Drive
Bogart, GA 30622
(706) 353-6547 (800) 852-3504
http://www.olisweb.com

Olympus America
2 Corporate Center Drive
Melville, NY 11747
(800) 645-8160　FAX: (516) 844-5959
(516) 844-5000
http://www.olympusamerica.com

Omega Engineering
One Omega Drive
P.O. Box 4047
Stamford, CT 06907
(800) 848-4286　FAX: (203) 359-7700
(203) 359-1660
http://www.omega.com

Omega Optical
3 Grove Street
P.O. Box 573
Brattleboro, VT 05302
(802) 254-2690　FAX: (802) 254-3937
http://www.omegafilters.com

Omnetics Connector Corporation
7260 Commerce Circle
East Minneapolis, MN 55432
(800) 343-0025 (763) 572-0656
Fax: (763) 572-3925
http://www.omnetics.com/main.htm

Omni International
6530 Commerce Court
Warrenton, VA 20187
(800) 776-4431　FAX: (540) 347-5352
(540) 347-5331
http://www.omni-inc.com

Omnion
2010 Energy Drive
P.O. Box 879
East Troy, WI 53120
(262) 642-7200　FAX: (262) 642-7760
http://www.omnion.com

Omnitech Electronics
See AccuScan Instruments

Oncogene Research Products
P.O. Box Box 12087
La Jolla, CA 92039-2087
(800) 662-2616 FAX: (800) 766-0999
http://www.apoptosis.com

Oncogene Science
See OSI Pharmaceuticals

Oncor
See Intergen

Online Instruments
130 Conway Drive, Suites A & B
Bogart, GA 30622
(800) 852-3504 (706) 353-1972
(706) 353-6547
http://www.olisweb.com

Operon Technologies
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501
(800) 688-2248 FAX: (510) 865-5225
(510) 865-8644
http://www.operon.com

Optiscan
P.O. Box 1066
Mount Waverly MDC, Victoria
Australia 3149
61-3-9538 3333 FAX: 61-3-9562 7742
http://www.optiscan.com.au

Optomax
9 Ash Street
P.O. Box 840
Hollis, NH 03049
(603) 465-3385 FAX: (603) 465-2291

Opto-Line Associates
265 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(978) 658-7255 FAX: (978) 658-7299
http://www.optoline.com

Orbigen
6827 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(866) 672-4436 (858) 362-2030
(858) 362-2026
http://www.orbigen.com

Oread BioSaftey
1501 Wakarusa Drive
Lawrence, KS 66047
(800) 447-6501 FAX: (785) 749-1882
(785) 749-0034
http://www.oread.com

Organomation Associates
266 River Road West
Berlin, MA 01503
(888) 978-7300 FAX: (978)838-2786
(978) 838-7300
http://www.organomation.com

Organon
375 Mount Pleasant Avenue
West Orange, NJ 07052
(800) 241-8812 FAX: (973) 325-4589
(973) 325-4500
http://www.organon.com

Organon Teknika (Canada)
30 North Wind Place
Scarborough, Ontario
M1S 3R5 Canada
(416) 754-4344 FAX: (416) 754-4488
http://www.organonteknika.com

Organon Teknika Cappel
100 Akzo Avenue
Durham, NC 27712
(800) 682-2666 FAX: (800) 432-9682
(919) 620-2000 FAX: (919) 620-2107
http://www.organonteknika.com

Oriel Corporation of America
150 Long Beach Boulevard
Stratford, CT 06615
(203) 377-8282 FAX: (203) 378-2457
http://www.oriel.com

OriGene Technologies
6 Taft Court, Suite 300
Rockville, MD 20850
(888) 267-4436 FAX: (301) 340-9254
(301) 340-3188
http://www.origene.com

OriginLab
One Roundhouse Plaza
Northhampton, MA 01060
(800) 969-7720 FAX: (413) 585-0126
http://www.originlab.com

Orion Research
500 Cummings Center
Beverly, MA 01915
(800) 225-1480 FAX: (978) 232-6015
(978) 232-6000
http://www.orionres.com

Ortho Diagnostic Systems
Subsidiary of Johnson & Johnson
1001 U.S. Highway 202
P.O. Box 350
Raritan, NJ 08869
(800) 322-6374 FAX: (908) 218-8582
(908) 218-1300

Ortho McNeil Pharmaceutical
Welsh & McKean Road
Spring House, PA 19477
(800) 682-6532
(215) 628-5000
http://www.orthomcneil.com

Oryza
200 Turnpike Road, Unit 5
Chelmsford, MA 01824
(978) 256-8183 FAX: (978) 256-7434
http://www.oryzalabs.com

OSI Pharmaceuticals
106 Charles Lindbergh Boulevard
Uniondale, NY 11553
(800) 662-2616 FAX: (516) 222-0114
(516) 222-0023
http://www.osip.com

Osmonics
135 Flanders Road
P.O. Box 1046
Westborough, MA 01581
(800) 444-8212 FAX: (508) 366-5840
(508) 366-8212
http://www.osmolabstore.com

Oster Professional Products
150 Cadillac Lane
McMinnville, TN 37110
(931) 668-4121 FAX: (931) 668-4125
http://www.sunbeam.com

Out Patient Services
1260 Holm Road
Petaluma, CA 94954
(800) 648-1666 FAX: (707) 762-7198
(707) 763-1581

OWL Scientific Plastics
See OWL Separation Systems

OWL Separation Systems
55 Heritage Avenue
Portsmouth, NH 03801
(800) 242-5560 FAX: (603) 559-9258
(603) 559-9297
http://www.owlsci.com

Oxford Biochemical Research
P.O. Box 522
Oxford, MI 48371
(800) 692-4633 FAX: (248) 852-4466
http://www.oxfordbiomed.com

Oxford GlycoSystems
See Glyco

Oxford Instruments
Old Station Way
Eynsham
Witney, Oxfordshire OX8 1TL, UK
(44) 1865-881437
FAX: (44) 1865-881944
http://www.oxinst.com

Oxford Labware
See Kendall

Oxford Molecular Group
Oxford Science Park
The Medawar Centre
Oxford OX4 4GA, UK
(44) 1865-784600
FAX: (44) 1865-784601
http://www.oxmol.co.uk

Oxford Molecular Group
2105 South Bascom Avenue, Suite 200
Campbell, CA 95008
(800) 876-9994 FAX: (408) 879-6302
(408) 879-6300
http://www.oxmol.com

OXIS International
6040 North Cutter Circle
Suite 317
Portland, OR 97217
(800) 547-3686 FAX: (503) 283-4058
(503) 283-3911
http://www.oxis.com

Oxoid
800 Proctor Avenue
Ogdensburg, NY 13669
(800) 567-8378 FAX: (613) 226-3728
http://www.oxoid.ca

Oxoid
Wade Road
Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, UK
(44) 1256-841144
FAX: (4) 1256-814626
http://www.oxoid.ca

Oxyrase
P.O. Box 1345
Mansfield, OH 44901
(419) 589-8800 FAX: (419) 589-9919
http://www.oxyrase.com

Ozyme
10 Avenue Ampere
Montigny de Bretoneux
78180 France
(33) 13-46-02-424
FAX: (33) 13-46-09-212
http://www.ozyme.fr

PAA Laboratories
2570 Route 724
P.O. Box 435
Parker Ford, PA 19457
(610) 495-9400 FAX: (610) 495-9410
http://www.paa-labs.com

Pacer Scientific
5649 Valley Oak Drive
Los Angeles, CA 90068
(323) 462-0636 FAX: (323) 462-1430
http://www.pacersci.com

Pacific Bio-Marine Labs
P.O. Box 1348
Venice, CA 90294
(310) 677-1056 FAX: (310) 677-1207

Packard Instrument
800 Research Parkway
Meriden, CT 06450
(800) 323-1891 FAX: (203) 639-2172
(203) 238-2351
http://www.packardinst.com

Padgett Instrument
1730 Walnut Street
Kansas City, MO 64108
(816) 842-1029

Pall Filtron
50 Bearfoot Road
Northborough, MA 01532
(800) FILTRON FAX: (508) 393-1874
(508) 393-1800

Pall-Gelman
25 Harbor Park Drive
Port Washington, NY 11050
(800) 289-6255 FAX: (516) 484-2651
(516) 484-3600
http://www.pall.com

PAN Biotech GmbH
Gewerbepark 13
D-94501 Aidenbach, Germany
(49) 8543-6016-30
Fax: (49) 8543-6016-49
http://www.pan-biotech.com

PanVera
545 Science Drive
Madison, WI 53711
(800) 791-1400 FAX: (608) 233-3007
(608) 233-9450
http://www.panvera.com

Parke-Davis
See Warner-Lambert

Parr Instrument
211 53rd Street
Moline, IL 61265
(800) 872-7720 FAX: (309) 762-9453
(309) 762-7716
http://www.parrinst.com

Partec
Otto Hahn Strasse 32
D-48161 Munster, Germany
(49) 2534-8008-0
FAX: (49) 2535-8008-90

PCR
See Archimica Florida

PE Biosystems
850 Lincoln Centre Drive
Foster City, CA 94404
(800) 345-5224 FAX: (650) 638-5884
(650) 638-5800
http://www.pebio.com

Pel-Freez Biologicals
219 N. Arkansas
P.O. Box 68
Rogers, AR 72757
(800) 643-3426 FAX: (501) 636-3562
(501) 636-4361
http://www.pelfreez-bio.com

Pel-Freez Clinical Systems
Subsidiary of Pel-Freez Biologicals
9099 N. Deerbrook Trail
Brown Deer, WI 53223
(800) 558-4511 FAX: (414) 357-4518
(414) 357-4500
http://www.pelfreez-bio.com

Peninsula Laboratories
601 Taylor Way
San Carlos, CA 94070
(800) 650-4442 FAX: (650) 595-4071
(650) 592-5392
http://www.penlabs.com

Pentex
24562 Mando Drive
Laguna Niguel, CA 92677
(800) 382-4667 FAX: (714) 643-2363
http://www.pentex.com

PeproTech
5 Crescent Avenue
P.O. Box 275
Rocky Hill, NJ 08553
(800) 436-9910 FAX: (609) 497-0321
(609) 497-0253
http://www.peprotech.com

Peptide Institute
4-1-2 Ina, Minoh-shi
Osaka 562-8686, Japan
81-727-29-4121 FAX: 81-727-29-4124
http://www.peptide.co.jp

Peptide Laboratory
4175 Lakeside Drive
Richmond, CA 94806
(800) 858-7322 FAX: (510) 262-9127
(510) 262-0800
http://www.peptidelab.com

Peptides International
11621 Electron Drive
Louisville, KY 40299
(800) 777-4779 FAX: (502) 267-1329
(502) 266-8787
http://www.pepnet.com

Perceptive Science Instruments
2525 South Shore Boulevard, Suite 100
League City, TX 77573
(281) 334-3027 FAX: (281) 538-2222
http://www.persci.com

Perimed
4873 Princeton Drive
North Royalton, OH 44133
(440) 877-0537 FAX: (440) 877-0534
http://www.perimed.se

Perkin-Elmer
761 Main Avenue
Norwalk, CT 06859
(800) 762-4002 FAX: (203) 762-6000
(203) 762-1000
http://www.perkin-elmer.com
See also PE Biosystems

PerSeptive Bioresearch Products
See PerSeptive BioSystems

PerSeptive BioSystems
500 Old Connecticut Path
Framingham, MA 01701
(800) 899-5858 FAX: (508) 383-7885
(508) 383-7700
http://www.pbio.com

PerSeptive Diagnostic
See PE Biosystems
(800) 343-1346

Pettersson Elektronik AB
Tallbacksvagen 51
S-756 45 Uppsala, Sweden
(46) 1830-3880 FAX: (46) 1830-3840
http://www.bahnhof.se/~pettersson

Pfanstiehl Laboratories, Inc.
1219 Glen Rock Avenue
Waukegan, IL 60085
(800) 383-0126 FAX: (847) 623-9173
http://www.pfanstiehl.com

PGC Scientifics
7311 Governors Way
Frederick, MD 21704
(800) 424-3300 FAX: (800) 662-1112
(301) 620-7777 FAX: (301) 620-7497
http://www.pgcscientifics.com

Pharmacia Biotech
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia Diagnostics
See Wallac

Pharmacia LKB Biotech
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia LKB Biotechnology
See Amersham Pharmacia Biotech

Pharmacia LKB Nuclear
See Wallac

Pharmaderm Veterinary Products
60 Baylis Road
Melville, NY 11747
(800) 432-6673
http://www.pharmaderm.com

Pharmed (Norton)
Norton Performance Plastics
See Saint-Gobain Performance Plastics

PharMingen
See BD PharMingen

Phenomex
2320 W. 205th Street
Torrance, CA 90501
(310) 212-0555 FAX: (310) 328-7768
http://www.phenomex.com

PHLS Centre for Applied
Microbiology and Research
See European Collection of Animal
Cell Cultures (ECACC)

Phoenix Flow Systems
11575 Sorrento Valley Road, Suite 208
San Diego, CA 92121
(800) 886-3569 FAX: (619) 259-5268
(619) 453-5095
http://www.phnxflow.com

Phoenix Pharmaceutical
4261 Easton Road, P.O. Box 6457
St. Joseph, MO 64506
(800) 759-3644 FAX: (816) 364-4969
(816) 364-5777
http://www.phoenixpharmaceutical.com

Photometrics
See Roper Scientific

Photon Technology International
1 Deerpark Drive, Suite F
Monmouth Junction, NJ 08852
(732) 329-0910 FAX: (732) 329-9069
http://www.pti-nj.com

Physik Instrumente
Polytec PI
23 Midstate Drive, Suite 212
Auburn, MA 01501
(508) 832-3456 FAX: (508) 832-0506
http://www.polytecpi.com

Physitemp Instruments
154 Huron Avenue
Clifton, NJ 07013
(800) 452-8510 FAX: (973) 779-5954
(973) 779-5577
http://www.physitemp.com

Pico Technology
The Mill House, Cambridge Street
St. Neots, Cambridgeshire
PE19 1QB, UK
(44) 1480-396-395
FAX: (44) 1480-396-296
http://www.picotech.com

Pierce Chemical
P.O. Box 117
3747 Meridian Road
Rockford, IL 61105
(800) 874-3723 FAX: (800) 842-5007
FAX: (815) 968-7316
http://www.piercenet.com

Pierce & Warriner
44, Upper Northgate Street
Chester, Cheshire CH1 4EF, UK
(44) 1244 382 525
FAX: (44) 1244 373 212
http://www.piercenet.com

Pilling Weck Surgical
420 Delaware Drive
Fort Washington, PA 19034
(800) 523-2579 FAX: (800) 332-2308
http://www.pilling-weck.com

PixelVision
A division of Cybex Computer Products
14964 NW Greenbrier Parkway
Beaverton, OR 97006
(503) 629-3210 FAX: (503) 629-3211
http://www.pixelvision.com

P.J. Noyes
P.O. Box 381
89 Bridge Street
Lancaster, NH 03584
(800) 522-2469 FAX: (603) 788-3873
(603) 788-4952
http://www.pjnoyes.com

Plas-Labs
917 E. Chilson Street
Lansing, MI 48906
(800) 866-7527 FAX: (517) 372-2857
(517) 372-7177
http://www.plas-labs.com

Plastics One
6591 Merriman Road, Southwest
P.O. Box 12004
Roanoke, VA 24018
(540) 772-7950 FAX: (540) 989-7519
http://www.plastics1.com

Platt Electric Supply
2757 6th Avenue South
Seattle, WA 98134
(206) 624-4083 FAX: (206) 343-6342
http://www.platt.com

Plexon
6500 Greenville Avenue
Suite 730
Dallas,TX 75206
(214) 369-4957 FAX: (214) 369-1775
http://www.plexoninc.com

Polaroid
784 Memorial Drive
Cambridge, MA 01239
(800) 225-1618 FAX: (800) 832-9003
(781) 386-2000
http://www.polaroid.com

Polyfiltronics
136 Weymouth St.
Rockland, MA 02370
(800) 434-7659 FAX: (781) 878-0822
(781) 878-1133
http://www.polyfiltronics.com

Polylabo Paul Block
Parc Tertiare de la Meinau
10, rue de la Durance
B.P. 36
67023 Strasbourg Cedex 1
Strasbourg, France
33-3-8865-8020
FAX: 33-3-8865-8039

PolyLC
9151 Rumsey Road, Suite 180
Columbia, MD 21045
(410) 992-5400 FAX: (410) 730-8340

Polymer Laboratories
Amherst Research Park
160 Old Farm Road
Amherst, MA 01002
(800) 767-3963 FAX: (413) 253-2476
http://www.polymerlabs.com

Polymicro Technologies
18019 North 25th Avenue
Phoenix, AZ 85023
(602) 375-4100 FAX: (602) 375-4110
http://www.polymicro.com

Polyphenols AS
Hanabryggene Technology Centre
Hanaveien 4-6
4327 Sandnes, Norway
(47) 51-62-0990
FAX: (47) 51-62-51-82
http://www.polyphenols.com

Polysciences
400 Valley Road
Warrington, PA 18976
(800) 523-2575 FAX: (800) 343-3291
http://www.polysciences.com

Polyscientific
70 Cleveland Avenue
Bayshore, NY 11706
(516) 586-0400 FAX: (516) 254-0618

Polytech Products
285 Washington Street
Somerville, MA 02143
(617) 666-5064 FAX: (617) 625-0975

Polytron
8585 Grovemont Circle
Gaithersburg, MD 20877
(301) 208-6597 FAX: (301) 208-8691
http://www.polytron.com

Popper and Sons
300 Denton Avenue
P.O. Box 128
New Hyde Park, NY 11040
(888) 717-7677 FAX: (800) 557-6773
(516) 248-0300 FAX: (516) 747-1188
http://www.popperandsons.com

Porphyrin Products
P.O. Box 31
Logan, UT 84323
(435) 753-1901 FAX: (435) 753-6731
http://www.porphyrin.com

Portex
See SIMS Portex Limited

Powderject Vaccines
585 Science Drive
Madison, WI 53711
(608) 231-3150 FAX: (608) 231-6990
http://www.powderject.com

Praxair
810 Jorie Boulevard
Oak Brook, IL 60521
(800) 621-7100
http://www.praxair.com

Precision Dynamics
13880 Del Sur Street
San Fernando, CA 91340
(800) 847-0670 FAX: (818) 899-4-45
http://www.pdcorp.com

Precision Scientific Laboratory
Equipment
Division of Jouan
170 Marcel Drive
Winchester, VA 22602
(800) 621-8820 FAX: (540) 869-0130
(540) 869-9892
http://www.precisionsci.com

Primary Care Diagnostics
See Becton Dickinson Primary
Care Diagnostics

Primate Products
1755 East Bayshore Road, Suite 28A
Redwood City, CA 94063
(650) 368-0663 FAX: (650) 368-0665
http://www.primateproducts.com

5 Prime → 3 Prime
See 2000 Eppendorf-5 Prime
http://www.5prime.com

Princeton Applied Research
PerkinElmer Instr.: Electrochemistry
801 S. Illinois
Oak Ridge, TN 37830
(800) 366-2741 FAX: (423) 425-1334
(423) 481-2442
http://www.eggpar.com

Princeton Instruments
A division of Roper Scientific
3660 Quakerbridge Road
Trenton, NJ 08619
(609) 587-9797 FAX: (609) 587-1970
http://www.prinst.com

Princeton Separations
P.O. Box 300
Aldephia, NJ 07710
(800) 223-0902 FAX: (732) 431-3768
(732) 431-3338

Prior Scientific
80 Reservoir Park Drive
Rockland, MA 02370
(781) 878-8442 FAX: (781) 878-8736
http://www.prior.com

PRO Scientific
P.O. Box 448
Monroe, CT 06468
(203) 452-9431 FAX: (203) 452-9753
http://www.proscientific.com

Professional Compounding Centers of America
9901 South Wilcrest Drive
Houston, TX 77099
(800) 331-2498 FAX: (281) 933-6227
(281) 933-6948
http://www.pccarx.com

Progen Biotechnik
Maass-Str. 30
69123 Heidelberg, Germany
(49) 6221-8278-0
FAX: (49) 6221-8278-23
http://www.progen.de

Prolabo
A division of Merck Eurolab
54 rue Roger Salengro
94126 Fontenay Sous Bois Cedex
France
33-1-4514-8500
FAX: 33-1-4514-8616
http://www.prolabo.fr

Proligo
2995 Wilderness Place
Boulder, CO 80301
(888) 80-OLIGO FAX: (303) 801-1134
http://www.proligo.com

Promega
2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711
(800) 356-9526 FAX: (800) 356-1970
(608) 274-4330 FAX: (608) 277-2516
http://www.promega.com

Protein Databases (PDI)
405 Oakwood Road
Huntington Station, NY 11746
(800) 777-6834 FAX: (516) 673-4502
(516) 673-3939

Protein Polymer Technologies
10655 Sorrento Valley Road
San Diego, CA 92121
(619) 558-6064 FAX: (619) 558-6477
http://www.ppti.com

Protein Solutions
391 G Chipeta Way
Salt Lake City, UT 84108
(801) 583-9301 FAX: (801) 583-4463
http://www.proteinsolutions.com

Prozyme
1933 Davis Street, Suite 207
San Leandro, CA 94577
(800) 457-9444 FAX: (510) 638-6919
(510) 638-6900
http://www.prozyme.com

PSI
See Perceptive Science Instruments

Pulmetrics Group
82 Beacon Street
Chestnut Hill, MA 02167
(617) 353-3833 FAX: (617) 353-6766

Purdue Frederick
100 Connecticut Avenue
Norwalk, CT 06850
(800) 633-4741 FAX: (203) 838-1576
(203) 853-0123
http://www.pharma.com

Purina Mills
LabDiet
P. O. Box 66812
St. Louis, MO 63166
(800) 227-8941 FAX: (314) 768-4894
http://www.purina-mills.com

Qbiogene
2251 Rutherford Road
Carlsbad, CA 92008
(800) 424-6101 FAX: (760) 918-9313
http://www.qbiogene.com

Qiagen
28159 Avenue Stanford
Valencia, CA 91355
(800) 426-8157 FAX: (800) 718-2056
http://www.qiagen.com

Quality Biological
7581 Lindbergh Drive
Gaithersburg, MD 20879
(800) 443-9331 FAX: (301) 840-5450
(301) 840-9331
http://www.qualitybiological.com

Quantitative Technologies
P.O. Box 470
Salem Industrial Park, Bldg. 5
Whitehouse, NJ 08888
(908) 534-4445 FAX: 534-1054
http://www.qtionline.com

Quantum Appligene
Parc d'Innovation
Rue Geller de Kayserberg
67402 Illkirch, Cedex, France
(33) 3-8867-5425
FAX: (33) 3-8867-1945
http://www.quantum-appligene.com

Quantum Biotechnologies
See Qbiogene

Quantum Soft
Postfach 6613
CH-8023
Zurich, Switzerland
FAX: 41-1-481-69-51
profit@quansoft.com

Questcor Pharmaceuticals
26118 Research Road
Hayward, CA 94545
(510) 732-5551 FAX: (510) 732-7741
http://www.questcor.com

Quidel
10165 McKellar Court
San Diego, CA 92121
(800) 874-1517 FAX: (858) 546-8955
(858) 552-1100
http://www.quidel.com

R-Biopharm
7950 Old US 27 South
Marshall, MI 49068
(616) 789-3033 FAX: (616) 789-3070
http://www.r-biopharm.com

R. C. Electronics
6464 Hollister Avenue
Santa Barbara, CA 93117
(805) 685-7770 FAX: (805) 685-5853
http://www.rcelectronics.com

R & D Systems
614 McKinley Place NE
Minneapolis, MN 55413
(800) 343-7475 FAX: (612) 379-6580
(612) 379-2956
http://www.rndsystems.com

R & S Technology
350 Columbia Street
Peacedale, RI 02880
(401) 789-5660 FAX: (401) 792-3890
http://www.septech.com

RACAL Health and Safety
See 3M
7305 Executive Way
Frederick, MD 21704
(800) 692-9500 FAX: (301) 695-8200

Radiometer America
811 Sharon Drive
Westlake, OH 44145
(800) 736-0600 FAX: (440) 871-2633
(440) 871-8900
http://www.rameusa.com

Radiometer A/S
The Chemical Reference Laboratory
Kandevej 21
DK-2700 Brnshj, Denmark
45-3827-3827 FAX: 45-3827-2727

Radionics
22 Terry Avenue
Burlington, MA 01803
(781) 272-1233 FAX: (781) 272-2428
http://www.radionics.com

Radnoti Glass Technology
227 W. Maple Avenue
Monrovia, CA 91016
(800) 428-l4l6 FAX: (626) 303-2998
(626) 357-8827
http://www.radnoti.com

Rainin Instrument
Rainin Road
P.O. Box 4026
Woburn, MA 01888
(800)-4-RAININ FAX: (781) 938-1152
(781) 935-3050
http://www.rainin.com

Rank Brothers
56 High Street
Bottisham, Cambridge
CB5 9DA UK
(44) 1223 811369
FAX: (44) 1223 811441
http://www.rankbrothers.com

Rapp Polymere
Ernst-Simon Strasse 9
D 72072 Tubingen, Germany
(49) 7071-763157
FAX: (49) 7071-763158
http://www.rapp-polymere.com

Raven Biological Laboratories
8607 Park Drive
P.O. Box 27261
Omaha, NE 68127
(800) 728-5702 FAX: (402) 593-0995
(402) 593-0781
http://www.ravenlabs.com

Razel Scientific Instruments
100 Research Drive
Stamford, CT 06906
(203) 324-9914 FAX: (203) 324-5568

RBI
See Research Biochemicals

Reagents International
See Biotech Source

Receptor Biology
10000 Virginia Manor Road, Suite 360
Beltsville, MD 20705
(888) 707-4200 FAX: (301) 210-6266
(301) 210-4700
http://www.receptorbiology.com

Regis Technologies
8210 N. Austin Avenue
Morton Grove, IL 60053
(800) 323-8144 FAX: (847) 967-1214
(847) 967-6000
http://www.registech.com

Reichert Ophthalmic Instruments
P.O. Box 123
Buffalo, NY 14240
(716) 686-4500 FAX: (716) 686-4545
http://www.reichert.com

Reiss
1 Polymer Place
P.O. Box 60
Blackstone, VA 23824
(800) 356-2829 FAX: (804) 292-1757
(804) 292-1600
http://www.reissmfg.com

Remel
12076 Santa Fe Trail Drive
P.O. Box 14428
Shawnee Mission, KS 66215
(800) 255-6730 FAX: (800) 621-8251
(913) 888-0939 FAX: (913) 888-5884
http://www.remelinc.com

Reming Bioinstruments
6680 County Route 17
Redfield, NY 13437
(315) 387-3414 FAX: (315) 387-3415

RepliGen
117 Fourth Avenue
Needham, MA 02494
(800) 622-2259 FAX: (781) 453-0048
(781) 449-9560
http://www.repligen.com

Research Biochemicals
1 Strathmore Road
Natick, MA 01760
(800) 736-3690 FAX: (800) 736-2480
(508) 651-8151 FAX: (508) 655-1359
http://www.resbio.com

Research Corporation Technologies
101 N. Wilmot Road, Suite 600
Tucson, AZ 85711
(520) 748-4400 FAX: (520) 748-0025
http://www.rctech.com

Research Diagnostics
Pleasant Hill Road
Flanders, NJ 07836
(800) 631-9384 FAX: (973) 584-0210
(973) 584-7093
http://www.researchd.com

Research Diets
121 Jersey Avenue
New Brunswick, NJ 08901
(877) 486-2486 FAX: (732) 247-2340
(732) 247-2390
http://www.researchdiets.com

Research Genetics
2130 South Memorial Parkway
Huntsville, AL 35801
(800) 533-4363 FAX: (256) 536-9016
(256) 533-4363
http://www.resgen.com

Research Instruments
Kernick Road Pernryn
Cornwall TR10 9DQ, UK
(44) 1326-372-753
FAX: (44) 1326-378-783
http://www.research-instruments.com

Research Organics
4353 E. 49th Street
Cleveland, OH 44125
(800) 321-0570 FAX: (216) 883-1576
(216) 883-8025
http://www.resorg.com

Research Plus
P.O. Box 324
Bayonne, NJ 07002
(800) 341-2296 FAX: (201) 823-9590
(201) 823-3592
http://www.researchplus.com

Research Products International
410 N. Business Center Drive
Mount Prospect, IL 60056
(800) 323-9814 FAX: (847) 635-1177
(847) 635-7330
http://www.rpicorp.com

Research Triangle Institute
P.O. Box 12194
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 541-6000 FAX: (919) 541-6515
http://www.rti.org

Restek
110 Benner Circle
Bellefonte, PA 16823
(800) 356-1688 FAX: (814) 353-1309
(814) 353-1300
http://www.restekcorp.com

Rheodyne
P.O. Box 1909
Rohnert Park, CA 94927
(707) 588-2000 FAX: (707) 588-2020
http://www.rheodyne.com

Rhone Merieux
See Merial Limited

Rhone-Poulenc
2 T W Alexander Drive
P.O. Box 12014
Research Triangle Park, NC 08512
(919) 549-2000 FAX: (919) 549-2839
http://www.Rhone-Poulenc.com
Also see Aventis

Rhone-Poulenc Rorer
500 Arcola Road
Collegeville, PA 19426
(800) 727-6737 FAX: (610) 454-8940
(610) 454-8975
http://www.rp-rorer.com

Rhone-Poulenc Rorer
Centre de Recherche de Vitry-Alfortville
13 Quai Jules Guesde, BP14 94403
Vitry Sur Seine, Cedex, France
(33) 145-73-85-11
FAX: (33) 145-73-81-29
http://www.rp-rorer.com

Ribi ImmunoChem Research
563 Old Corvallis Road
Hamilton, MT 59840
(800) 548-7424 FAX: (406) 363-6129
(406) 363-3131
http://www.ribi.com

RiboGene
See Questcor Pharmaceuticals

Ricca Chemical
448 West Fork Drive
Arlington, TX 76012
(888) GO-RICCA FAX: (800) RICCA-93
(817) 461-5601
http://www.riccachemical.com

Richard-Allan Scientific
225 Parsons Street
Kalamazoo, MI 49007
(800) 522-7270 FAX: (616) 345-3577
(616) 344-2400
http://www.rallansci.com

Richelieu Biotechnologies
11 177 Hamon
Montral, Quebec
H3M 3E4 Canada
(802) 863-2567 FAX: (802) 862-2909
http://www.richelieubio.com

Richter Enterprises
20 Lake Shore Drive
Wayland, MA 01778
(508) 655-7632 FAX: (508) 652-7264
http://www.richter-enterprises.com

Riese Enterprises
BioSure Division
12301 G Loma Rica Drive
Grass Valley, CA 95945
(800) 345-2267 FAX: (916) 273-5097
(916) 273-5095
http://www.biosure.com

Robbins Scientific
1250 Elko Drive
Sunnyvale, CA 94086
(800) 752-8585 FAX: (408) 734-0300
(408) 734-8500
http://www.robsci.com

Roboz Surgical Instruments
9210 Corporate Boulevard, Suite 220
Rockville, MD 20850
(800) 424-2984 FAX: (301) 590-1290
(301) 590-0055

Roche Diagnostics
9115 Hague Road
P.O. Box 50457
Indianapolis, IN 46256
(800) 262-1640 FAX: (317) 845-7120
(317) 845-2000
http://www.roche.com

Roche Molecular Systems
See Roche Diagnostics

Rocklabs
P.O. Box 18-142
Auckland 6, New Zealand
(64) 9-634-7696
FAX: (64) 9-634-7696
http://www.rocklabs.com

Rockland
P.O. Box 316
Gilbertsville, PA 19525
(800) 656-ROCK FAX: (610) 367-7825
(610) 369-1008
http://www.rockland-inc.com

Rohm
Chemische Fabrik
Kirschenallee
D-64293 Darmstadt, Germany
(49) 6151-1801 FAX: (49) 6151-1802
http://www.roehm.com

Roper Scientific
3440 East Brittania Drive, Suite 100
Tucson, AZ 85706
(520) 889-9933 FAX: (520) 573-1944
http://www.roperscientific.com

Rosetta Inpharmatics
12040 115th Avenue NE
Kirkland, WA 98034
(425) 820-8900 FAX: (425) 820-5757
http://www.rii.com

ROTH-SOCHIEL
3 rue de la Chapelle
Lauterbourg
67630 France
(33) 03-88-94-82-42
FAX: (33) 03-88-54-63-93

Rotronic Instrument
160 E. Main Street
Huntington, NY 11743
(631) 427-3898 FAX: (631) 427-3902
http://www.rotronic-usa.com

Roundy's
23000 Roundy Drive
Pewaukee, WI 53072
(262) 953-7999 FAX: (262) 953-7989
http://www.roundys.com

RS Components
Birchington Road
Weldon Industrial Estate
Corby, Northants NN17 9RS, UK
(44) 1536 201234
FAX: (44) 1536 405678
http://www.rs-components.com

Rubbermaid
See Newell Rubbermaid

SA Instrumentation
1437 Tzena Way
Encinitas, CA 92024
(858) 453-1776 FAX: (800) 266-1776
http://www.sainst.com

Safe Cells
See Bionique Testing Labs

Sage Instruments
240 Airport Boulevard
Freedom, CA 95076
831-761-1000 FAX: 831-761-1008
http://www.sageinst.com

Sage Laboratories
11 Huron Drive
Natick, MA 01760
(508) 653-0844 FAX: 508-653-5671
http://www.sagelabs.com

Saint-Gobain Performance Plastics
P.O. Box 3660
Akron, OH 44309
(330) 798-9240 FAX: (330) 798-6968
http://www.nortonplastics.com

San Diego Instruments
7758 Arjons Drive
San Diego, CA 92126
(858) 530-2600 FAX: (858) 530-2646
http://www.sd-inst.com

Sandown Scientific
Beards Lodge
25 Oldfield Road
Hampden, Middlesex TW12 2AJ, UK
(44) 2089 793300
FAX: (44) 2089 793311
http://www.sandownsci.com

Sandoz Pharmaceuticals
See Novartis

Sanofi Recherche
Centre de Montpellier
371 Rue du Professor Blayac
34184 Montpellier, Cedex 04
France
(33) 67-10-67-10
FAX: (33) 67-10-67-67

Sanofi Winthrop Pharmaceuticals
90 Park Avenue
New York, NY 10016
(800) 223-5511 FAX: (800) 933-3243
(212) 551-4000
http://www.sanofi-synthelabo.com/us

Santa Cruz Biotechnology
2161 Delaware Avenue
Santa Cruz, CA 95060
(800) 457-3801 FAX: (831) 457-3801
(831) 457-3800
http://www.scbt.com

Sarasep
(800) 605-0267 FAX: (408) 432-3231
(408) 432-3230
http://www.transgenomic.com

Sarstedt
P.O. Box 468
Newton, NC 28658
(800) 257-5101 FAX: (828) 465-4003
(828) 465-4000
http://www.sarstedt.com

Sartorius
131 Heartsland Boulevard
Edgewood, NY 11717
(800) 368-7178 FAX: (516) 254-4253
http://www.sartorius.com

SAS Institute
Pacific Telesis Center
One Montgomery Street
San Francisco, CA 94104
(415) 421-2227 FAX: (415) 421-1213
http://www.sas.com

Savant/EC Apparatus
A ThermoQuest company
100 Colin Drive
Holbrook, NY 11741
(800) 634-8886 FAX: (516) 244-0606
(516) 244-2929
http://www.savec.com

Savillex
6133 Baker Road
Minnetonka, MN 55345
(612) 935-5427

Scanalytics
Division of CSP
8550 Lee Highway, Suite 400
Fairfax, VA 22031
(800) 325-3110 FAX: (703) 208-1960
(703) 208-2230
http://www.scanalytics.com

Schering Laboratories
See Schering-Plough

Schering-Plough
1 Giralda Farms
Madison, NJ 07940
(800) 222-7579 FAX: (973) 822-7048
(973) 822-7000
http://www.schering-plough.com

Schleicher & Schuell
10 Optical Avenue
Keene, NH 03431
(800) 245-4024 FAX: (603) 357-3627
(603) 352-3810
http://www.s-und-s.de/english-index.html

Science Technology Centre
1250 Herzberg Laboratories
Carleton University
1125 Colonel Bay Drive
Ottawa, Ontario
K1S 5B6 Canada
(613) 520-4442 FAX: (613) 520-4445
http://www.carleton.ca/universities/stc

Scientific Instruments
200 Saw Mill River Road
Hawthorne, NY 10532
(800) 431-1956 FAX: (914) 769-5473
(914) 769-5700
http://www.scientificinstruments.com

Scientific Solutions
9323 Hamilton
Mentor, OH 44060
(440) 357-1400 FAX: (440) 357-1416
http://www.labmaster.com

Scion
82 Worman's Mill Court, Suite H
Frederick, MD 21701
(301) 695-7870 FAX: (301) 695-0035
http://www.scioncorp.com

Scott Specialty Gases
6141 Easton Road
P.O. Box 310
Plumsteadville, PA 18949
(800) 21-SCOTT FAX: (215) 766-2476
(215) 766-8861
http://www.scottgas.com

Scripps Clinic and Research
Foundation
Instrumentation and Design Lab
10666 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(800) 992-9962 FAX: (858) 554-8986
(858) 455-9100
http://www.scrippsclinic.com

SDI Sensor Devices
407 Pilot Court, 400A
Waukesha, WI 53188
(414) 524-1000 FAX: (414) 524-1009

Sefar America
111 Calumet Street
Depew, NY 14043
(716) 683-4050 FAX: (716) 683-4053
http://www.sefaramerica.com

Seikagaku America
Division of Associates of Cape Cod
704 Main Street
Falmouth, MA 02540
(800) 237-4512 FAX: (508) 540-8680
(508) 540-3444
http://www.seikagaku.com

Sellas Medizinische Gerate
Hagener Str. 393
Gevelsberg-Vogelsang, 58285
Germany
(49) 23-326-1225

Sensor Medics
22705 Savi Ranch Parkway
Yorba Linda, CA 92887
(800) 231-2466 FAX: (714) 283-8439
(714) 283-2228
http://www.sensormedics.com

Sensor Systems LLC
2800 Anvil Street, North
Saint Petersburg, FL 33710
(800) 688-2181 FAX: (727) 347-3881
(727) 347-2181
http://www.vsensors.com

SenSym/Foxboro ICT
1804 McCarthy Boulevard
Milpitas, CA 95035
(800) 392-9934 FAX: (408) 954-9458
(408) 954-6700
http://www.sensym.com

Separations Group
See Vydac

Sepracor
111 Locke Drive
Marlboro, MA 01752
(877)-SEPRACOR (508) 357-7300
http://www.sepracor.com

Sera-Lab
See Harlan Sera-Lab

Sermeter
925 Seton Court, #7
Wheeling, IL 60090
(847) 537-4747

Serological
195 W. Birch Street
Kankakee, IL 60901
(800) 227-9412 FAX: (815) 937-8285
(815) 937-8270

Seromed Biochrom
Leonorenstrasse 2-6
D-12247 Berlin, Germany
(49) 030-779-9060

Serotec
22 Bankside
Station Approach
Kidlington, Oxford OX5 1JE, UK
(44) 1865-852722
FAX: (44) 1865-373899
In the US: (800) 265-7376
http://www.serotec.co.uk

Serva Biochemicals
Distributed by Crescent Chemical

S.F. Medical Pharmlast
See Chase-Walton Elastomers

SGE
2007 Kramer Lane
Austin, TX 78758
(800) 945-6154 FAX: (512) 836-9159
(512) 837-7190
http://www.sge.com

Shandon/Lipshaw
171 Industry Drive
Pittsburgh, PA 15275
(800) 245-6212 FAX: (412) 788-1138
(412) 788-1133
http://www.shandon.com

Sharpoint
P.O. Box 2212
Taichung, Taiwan
Republic of China
(886) 4-3206320
FAX: (886) 4-3289879
http://www.sharpoint.com.tw

Shelton Scientific
230 Longhill Crossroads
Shelton, CT 06484
(800) 222-2092 FAX: (203) 929-2175
(203) 929-8999
http://www.sheltonscientific.com

Sherwood-Davis & Geck
See Kendall

Sherwood Medical
See Kendall

Shimadzu Scientific Instruments
7102 Riverwood Drive
Columbia, MD 21046
(800) 477-1227 FAX: (410) 381-1222
(410) 381-1227
http://www.ssi.shimadzu.com

Sialomed
See Amika

Siemens Analytical X-Ray Systems
See Bruker Analytical X-Ray Systems

Sievers Instruments
Subsidiary of Ionics
6060 Spine Road
Boulder, CO 80301
(800) 255-6964 FAX: (303) 444-6272
(303) 444-2009
http://www.sieversinst.com

SIFCO
970 East 46th Street
Cleveland, OH 44103
(216) 881-8600 FAX: (216) 432-6281
http://www.sifco.com

Sigma-Aldrich
3050 Spruce Street
St. Louis, MO 63103
(800) 358-5287 FAX: (800) 962-9591
(800) 325-3101 FAX: (800) 325-5052
http://www.sigma-aldrich.com

Sigma-Aldrich Canada
2149 Winston Park Drive
Oakville, Ontario
L6H 6J8 Canada
(800) 5652D1400 FAX: (800)
2652D3858
http://www.sigma-aldrich.com

Silenus/Amrad
34 Wadhurst Drive
Boronia, Victoria 3155 Australia
(613)9887-3909 FAX: (613) 9887-3912
http://www.amrad.com.au

Silicon Genetics
2601 Spring Street
Redwood City, CA 94063
(866) SIG SOFT FAX: (650) 365 1735
(650) 367 9600
http://www.sigenetics.com

SIMS Deltec
1265 Grey Fox Road
St. Paul, Minnesota 55112
(800) 426-2448 FAX: (615) 628-7459
http://www.deltec.com

SIMS Portex
10 Bowman Drive
Keene, NH 03431
(800) 258-5361 FAX: (603) 352-3703
(603) 352-3812
http://www.simsmed.com

SIMS Portex Limited
Hythe, Kent CT21 6JL, UK
(44)1303-260551
FAX: (44)1303-266761
http://www.portex.com

Siris Laboratories
See Biosearch Technologies

Skatron Instruments
See Molecular Devices

SLM Instruments
See Spectronic Instruments

SLM-AMINCO Instruments
See Spectronic Instruments

Small Parts
13980 NW 58th Court
P.O. Box 4650
Miami Lakes, FL 33014
(800) 220-4242 FAX: (800) 423-9009
(305) 558-1038 FAX: (305) 558-0509
http://www.smallparts.com

Smith & Nephew
11775 Starkey Road
P.O. Box 1970
Largo, FL 33779
(800) 876-1261
http://www.smith-nephew.com

SmithKline Beecham
1 Franklin Plaza, #1800
Philadelphia, PA 19102
(215) 751-4000 FAX: (215) 751-4992
http://www.sb.com

Solid Phase Sciences
See Biosearch Technologies

SOMA Scientific Instruments
5319 University Drive, PMB #366
Irvine, CA 92612
(949) 854-0220 FAX: (949) 854-0223
http://somascientific.com

Somatix Therapy
See Cell Genesys

Sonics & Materials
53 Church Hill Road
Newtown, CT 06470
(800) 745-1105 FAX: (203) 270-4610
(203) 270-4600
http://www.sonicsandmaterials.com

Sonosep Biotech
See Triton Environmental Consultants

Sorvall
See Kendro Laboratory Products

Southern Biotechnology Associates
P.O. Box 26221
Birmingham, AL 35260
(800) 722-2255 FAX: (205) 945-8768
(205) 945-1774
http://SouthernBiotech.com

SPAFAS
190 Route 165
Preston, CT 06365
(800) SPAFAS-1 FAX: (860) 889-1991
(860) 889-1389
http://www.spafas.com

Specialty Media
Division of Cell & Molecular Technologies
580 Marshall Street
Phillipsburg, NJ 08865
(800) 543-6029 FAX: (908) 387-1670
(908) 454-7774
http://www.specialtymedia.com

Spectra Physics
See Thermo Separation Products

Spectramed
See BOC Edwards

SpectraSource Instruments
31324 Via Colinas, Suite 114
Westlake Village, CA 91362
(818) 707-2655 FAX: (818) 707-9035
http://www.spectrasource.com

Spectronic Instruments
820 Linden Avenue
Rochester, NY 14625
(800) 654-9955 FAX: (716) 248-4014
(716) 248-4000
http://www.spectronic.com

Spectrum Medical Industries
See Spectrum Laboratories

Spectrum Laboratories
18617 Broadwick Street
Rancho Dominguez, CA 90220
(800) 634-3300 FAX: (800) 445-7330
(310) 885-4601 FAX: (310) 885-4666
http://www.spectrumlabs.com

Spherotech
1840 Industrial Drive, Suite 270
Libertyville, IL 60048
(800) 368-0822 FAX: (847) 680-8927
(847) 680-8922
http://www.spherotech.com

SPSS
233 S. Wacker Drive, 11th floor
Chicago, IL 60606
(800) 521-1337 FAX: (800) 841-0064
http://www.spss.com

SS White Burs
1145 Towbin Avenue
Lakewood, NJ 08701
(732) 905-1100 FAX: (732) 905-0987
http://www.sswhiteburs.com

Stag Instruments
16 Monument Industrial Park
Chalgrove, Oxon OX44 7RW, UK
(44) 1865-891116
FAX: (44) 1865-890562

Standard Reference Materials Program
National Institute of Standards and Technology
Building 202, Room 204
Gaithersburg, MD 20899
(301) 975-6776 FAX: (301) 948-3730

Starna Cells
P.O. Box 1919
Atascandero, CA 93423
(805) 466-8855 FAX: (805) 461-1575
(800) 228-4482
http://www.starnacells.com

Starplex Scientific
50 Steinway
Etobieoke, Ontario
M9W 6Y3 Canada
(800) 665-0954 FAX: (416) 674-6067
(416) 674-7474
http://www.starplexscientific.com

State Laboratory Institute of Massachusetts
305 South Street
Jamaica Plain, MA 02130
(617) 522-3700 FAX: (617) 522-8735
http://www.state.ma.us/dph

Stedim Labs
1910 Mark Court, Suite 110
Concord, CA 94520
(800) 914-6644 FAX: (925) 689-6988
(925) 689-6650
http://www.stedim.com

Steinel America
9051 Lyndale Avenue
Bloomington, MN 55420
(800) 852 4343 FAX: (952) 888-5132
http://www.steinelamerica.com

Stem Cell Technologies
777 West Broadway, Suite 808
Vancouver, British Columbia
V5Z 4J7 Canada
(800) 667-0322 FAX: (800) 567-2899
(604) 877-0713 FAX: (604) 877-0704
http://www.stemcell.com

Stephens Scientific
107 Riverdale Road
Riverdale, NJ 07457
(800) 831-8099 FAX: (201) 831-8009
(201) 831-9800

Steraloids
P.O. Box 689
Newport, RI 02840
(401) 848-5422 FAX: (401) 848-5638
http://www.steraloids.com

Sterling Medical
2091 Springdale Road, Ste. 2
Cherry Hill, NJ 08003
(800) 229-0900 FAX: (800) 229-7854
http://www.sterlingmedical.com

Sterling Winthrop
90 Park Avenue
New York, NY 10016
(212) 907-2000 FAX: (212) 907-3626

Sternberger Monoclonals
10 Burwood Court
Lutherville, MD 21093
(410) 821-8505 FAX: (410) 821-8506
http://www.sternbergermonoclonals.com

Stoelting
502 Highway 67
Kiel, WI 53042
(920) 894-2293 FAX: (920) 894-7029
http://www.stoelting.com

Stovall Lifescience
206-G South Westgate Drive
Greensboro, NC 27407
(800) 852-0102 FAX: (336) 852-3507
http://www.slscience.com

Stratagene
11011 N. Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037
(800) 424-5444 FAX: (888) 267-4010
(858) 535-5400
http://www.stratagene.com

Strategic Applications
530A N. Milwaukee Avenue
Libertyville, IL 60048
(847) 680-9385 FAX: (847) 680-9837

Strem Chemicals
7 Mulliken Way
Newburyport, MA 01950
(800) 647-8736 FAX: (800) 517-8736
(978) 462-3191 FAX: (978) 465-3104
http://www.strem.com

StressGen Biotechnologies
Biochemicals Division
120-4243 Glanford Avenue
Victoria, British Columbia
V8Z 4B9 Canada
(800) 661-4978 FAX: (250) 744-2877
(250) 744-2811
http://www.stressgen.com

Structure Probe/SPI Supplies
(Epon-Araldite)
P.O. Box 656
West Chester, PA 19381
(800) 242-4774 FAX: (610) 436-5755
http://www.2spi.com

Sud-Chemie Performance Packaging
101 Christine Drive
Belen, NM 87002
(800) 989-3374 FAX: (505) 864-9296
http://www.uniteddesiccants.com

Sumitomo Chemical
Sumitomo Building
5-33, Kitahama 4-chome
Chuo-ku, Osaka 541-8550, Japan
(81) 6-6220-3891
FAX: (81)-6-6220-3345
http://www.sumitomo-chem.co.jp

Sun Box
19217 Orbit Drive
Gaithersburg, MD 20879
(800) 548-3968 FAX: (301) 977-2281
(301) 869-5980
http://www.sunboxco.com

Sunbrokers
See Sun International

Sun International
3700 Highway 421 North
Wilmington, NC 28401
(800) LAB-VIAL FAX: (800) 231-7861
http://www.autosamplervial.com

Sunox
1111 Franklin Boulevard, Unit 6
Cambridge, Ontario
N1R 8B5 Canada
(519) 624-4413 FAX: (519) 624-8378
http://www.sunox.ca

Supelco
See Sigma-Aldrich

SuperArray
P.O. Box 34494
Bethesda, MD 20827
(888) 503-3187 FAX: (301) 765-9859
(301) 765-9888
http://www.superarray.com

Surface Measurement Systems
3 Warple Mews, Warple Way
London W3 ORF, UK
(44) 20-8749-4900
FAX: (44) 20-8749-6749
http://www.smsuk.co.uk/index.htm

SurgiVet
N7 W22025 Johnson Road, Suite A
Waukesha, WI 53186
(262) 513-8500 (888) 745-6562
FAX: (262) 513-9069
http://www.surgivet.com

Sutter Instruments
51 Digital Drive
Novato, CA 94949
(415) 883-0128 FAX: (415) 883-0572
http://www.sutter.com

Swiss Precision Instruments
1555 Mittel Boulevard, Suite F
Wooddale, IL 60191
(800) 221-0198 FAX: (800) 842-5164

Synaptosoft
3098 Anderson Place
Decatur, GA 30033
(770) 939-4366 FAX: 770-939-9478
http://www.synaptosoft.com

SynChrom
See Micra Scientific

Synergy Software
2457 Perkiomen Avenue
Reading, PA 19606
(800) 876-8376 FAX: (610) 370-0548
(610) 779-0522
http://www.synergy.com

Synteni
See Incyte

Synthetics Industry
Lumite Division
2100A Atlantic Highway
Gainesville, GA 30501
(404) 532-9756 FAX: (404) 531-1347

Systat
See SPSS

Systems Planning and Analysis (SPA)
2000 N. Beauregard Street
Suite 400
Alexandria, VA 22311
(703) 931-3500
http://www.spa-inc.net

3M Bioapplications
3M Center
Building 270-15-01
St. Paul, MN 55144
(800) 257-7459 FAX: (651) 737-5645
(651) 736-4946

T Cell Diagnostics and T Cell Sciences
38 Sidney Street
Cambridge, MA 02139
(617) 621-1400

TAAB Laboratory Equipment
3 Minerva House
Calleva Park
Aldermaston, Berkshire RG7 8NA, UK
(44) 118 9817775
FAX: (44) 118 9817881

Taconic
273 Hover Avenue
Germantown, NY 12526
(800) TAC-ONIC FAX: (518) 537-7287
(518) 537-6208
http://www.taconic.com

Tago
See Biosource International

TaKaRa Biochemical
719 Alliston Way
Berkeley, CA 94710
(800) 544-9899 FAX: (510) 649-8933
(510) 649-9895
http://www.takara.co.jp/english

Takara Shuzo
Biomedical Group Division
Seta 3-4-1
Otsu Shiga 520-21, Japan
(81) 75-241-5100
FAX: (81) 77-543-9254
http://www.Takara.co.jp/english

Takeda Chemical Products
101 Takeda Drive
Wilmington, NC 28401
(800) 825-3328 FAX: (800) 825-0333
(910) 762-8666 FAX: (910) 762-6846
http://takeda-usa.com

TAO Biomedical
73 Manassas Court
Laurel Springs, NJ 08021
(609) 782-8622 FAX: (609) 782-8622

Tecan US
P.O. Box 13953
Research Triangle Park, NC 27709
(800) 33-TECAN FAX: (919) 361-5201
(919) 361-5208
http://www.tecan-us.com

Techne
University Park Plaza
743 Alexander Road
Princeton, NJ 08540
(800) 225-9243 FAX: (609) 987-8177
(609) 452-9275
http://www.techneusa.com

Technical Manufacturing
15 Centennial Drive
Peabody, MA 01960
(978) 532-6330 FAX: (978) 531-8682
http://www.techmfg.com

Technical Products International
5918 Evergreen
St. Louis, MO 63134
(800) 729-4451 FAX: (314) 522-6360
(314) 522-8671
http://www.vibratome.com

Technicon
See Organon Teknika Cappel

Techno-Aide
P.O. Box 90763
Nashville, TN 37209
(800) 251-2629 FAX: (800) 554-6275
(615) 350-7030
http://www.techno-aid.com

Ted Pella
4595 Mountain Lakes Boulevard
P.O. Box 492477
Redding, CA 96049
(800) 237-3526 FAX: (530) 243-3761
(530) 243-2200
http://www.tedpella.com

Tekmar-Dohrmann
P.O. Box 429576
Cincinnati, OH 45242
(800) 543-4461 FAX: (800) 841-5262
(513) 247-7000 FAX: (513) 247-7050

Tektronix
142000 S.W. Karl Braun Drive
Beaverton, OR 97077
(800) 621-1966 FAX: (503) 627-7995
(503) 627-7999
http://www.tek.com

Tel-Test
P.O. Box 1421
Friendswood, TX 77546
(800) 631-0600 FAX: (281) 482-1070
(281)482-2672
http://www.isotex-diag.com

TeleChem International
524 East Weddell Drive, Suite 3
Sunnyvale, CA 94089
(408) 744-1331 FAX: (408) 744-1711
http://www.gst.net/~telechem

Terrachem
Mallaustrasse 57
D-68219 Mannheim, Germany
0621-876797-0 FAX: 0621-876797-19
http://www.terrachem.de

Terumo Medical
2101 Cottontail Lane
Somerset, NJ 08873
(800) 283-7866 FAX: (732) 302-3083
(732) 302-4900
http://www.terumomedical.com

Tetko
333 South Highland Manor
Briarcliff, NY 10510
(800) 289-8385 FAX: (914) 941-1017
(914) 941-7767
http://www.tetko.com

TetraLink
4240 Ridge Lea Road
Suite 29
Amherst, NY 14226
(800) 747-5170 FAX: (800) 747-5171
http://www.tetra-link.com

TEVA Pharmaceuticals USA
1090 Horsham Road
P.O. Box 1090
North Wales, PA 19454
(215) 591-3000 FAX: (215) 721-9669
http://www.tevapharmusa.com

Texas Fluorescence Labs
9503 Capitol View Drive
Austin, TX 78747
(512) 280-5223 FAX: (512) 280-4997
http://www.teflabs.com

The Nest Group
45 Valley Road
Southborough, MA 01772
(800) 347-6378 FAX: (508) 485-5736
(508) 481-6223
http://world.std.com/~nestgrp

ThermoCare
P.O. Box 6069
Incline Village, NV 89450
(800) 262-4020
(775) 831-1201

Thermo Labsystems
8 East Forge Parkway
Franklin, MA 02038
(800) 522-7763 FAX: (508) 520-2229
(508) 520-0009
http://www.finnpipette.com

Thermometric
Spjutvagen 5A
S-175 61 Jarfalla, Sweden
(46) 8-564-72-200

Thermoquest
IEC Division
300 Second Avenue
Needham Heights, MA 02194
(800) 843-1113 FAX: (781) 444-6743
(781) 449-0800
http://www.thermoquest.com

Thermo Separation Products
Thermoquest
355 River Oaks Parkway
San Jose, CA 95134
(800) 538-7067 FAX: (408) 526-9810
(408) 526-1100
http://www.thermoquest.com

Thermo Shandon
171 Industry Drive
Pittsburgh, PA 15275
(800) 547-7429 FAX: (412) 899-4045
http://www.thermoshandon.com

Thermo Spectronic
820 Linden Avenue
Rochester, NY 14625
(585) 248-4000 FAX: (585) 248-4200
http://www.thermo.com

Thomas Scientific
99 High Hill Road at I-295
Swedesboro, NJ 08085
(800) 345-2100 FAX: (800) 345-5232
(856) 467-2000 FAX: (856) 467-3087
http://www.wheatonsci.com/html/nt/Thomas.html

Thomson Instrument
354 Tyler Road
Clearbrook, VA 22624
(800) 842-4752 FAX: (540) 667-6878
(800) 541-4792 FAX: (760) 757-9367
http://www.hplc.com

Thorn EMI
See Electron Tubes

Thorlabs
435 Route 206
Newton, NJ 07860
(973) 579-7227 FAX: (973) 383-8406
http://www.thorlabs.com

Tiemann
See Bernsco Surgical Supply

Timberline Instruments
1880 South Flatiron Court, H-2
P.O. Box 20356
Boulder, CO 80308
(800) 777-5996 FAX: (303) 440-8786
(303) 440-8779
http://www.timberlineinstruments.com

TissueInformatics
711 Bingham Street, Suite 202
Pittsburgh, PA 15203
(418) 488-1100 FAX: (418) 488-6172
http://www.tissueinformatics.com

Tissue-Tek
A Division of Sakura Finetek USA
1750 West 214th Street
Torrance, CA 90501
(800) 725-8723 FAX: (310) 972-7888
(310) 972-7800
http://www.sakuraus.com

Tocris Cookson
114 Holloway Road, Suite 200
Ballwin, MO 63011
(800) 421-3701 FAX: (800) 483-1993
(636) 207-7651 FAX: (636) 207-7683
http://www.tocris.com

Tocris Cookson
Northpoint, Fourth Way
Avonmouth, Bristol BS11 8TA, UK
(44) 117-982-6551
FAX: (44) 117-982-6552
http://www.tocris.com

Tomtec
See CraMar Technologies

TopoGen
P.O. Box 20607
Columbus, OH 43220
(800) TOPOGEN
FAX: (800) ADD-TOPO
(614) 451-5810 FAX: (614) 451-5811
http://www.topogen.com

Toray Industries, Japan
Toray Building 2-1
Nihonbash-Muromach
2-Chome, Chuo-Ku
Tokyo, Japan 103-8666
(03) 3245-5115 FAX: (03) 3245-5555
http://www.toray.co.jp

Toray Industries, U.S.A.
600 Third Avenue
New York, NY 10016
(212) 697-8150 FAX: (212) 972-4279
http://www.toray.com

Toronto Research Chemicals
2 Brisbane Road
North York, Ontario
M3J 2J8 Canada
(416) 665-9696 FAX: (416) 665-4439
http://www.trc-canada.com

TosoHaas
156 Keystone Drive
Montgomeryville, PA 18036
(800) 366-4875 FAX: (215) 283-5035
(215) 283-5000
http://www.tosohaas.com

Towhill
647 Summer Street
Boston, MA 02210
(617) 542-6636 FAX: (617) 464-0804

Toxin Technology
7165 Curtiss Avenue
Sarasota, FL 34231
(941) 925-2032 FAX: (9413) 925-2130
http://www.toxintechnology.com

Toyo Soda
See TosoHaas

Trace Analytical
3517-A Edison Way
Menlo Park, CA 94025
(650) 364-6895 FAX: (650) 364-6897
http://www.traceanalytical.com

Transduction Laboratories
See BD Transduction Laboratories

Transgenomic
2032 Concourse Drive
San Jose, CA 95131
(408) 432-3230 FAX: (408) 432-3231
http://www.transgenomic.com

Transonic Systems
34 Dutch Mill Road
Ithaca, NY 14850
(800) 353-3569 FAX: (607) 257-7256
http://www.transonic.com

Travenol Lab
See Baxter Healthcare

Tree Star Software
20 Winding Way
San Carlos, CA 94070
800-366-6045
http://www.treestar.com

Trevigen
8405 Helgerman Court
Gaithersburg, MD 20877
(800) TREVIGEN
FAX: (301) 216-2801
(301) 216-2800
http://www.trevigen.com

Trilink Biotechnologies
6310 Nancy Ridge Drive
San Diego, CA 92121
(800) 863-6801 FAX: (858) 546-0020
http://www.trilink.biotech.com

Tripos Associates
1699 South Hanley Road, Suite 303
St. Louis, MO 63144
(800) 323-2960 FAX: (314) 647-9241
(314) 647-1099
http://www.tripos.com

Triton Environmental Consultants
120-13511 Commerce Parkway
Richmond, British Columbia
V6V 2L1 Canada
(604) 279-2093 FAX: (604) 279-2047
http://www.triton-env.com

Tropix
47 Wiggins Avenue
Bedford, MA 01730
(800) 542-2369 FAX: (617) 275-8581
(617) 271-0045
http://www.tropix.com

TSI Center for Diagnostic Products
See Intergen

2000 Eppendorf-5 Prime
5603 Arapahoe Avenue
Boulder, CO 80303
(800) 533-5703 FAX: (303) 440-0835
(303) 440-3705

Tyler Research
10328 73rd Avenue
Edmonton, Alberta
T6E 6N5 Canada
(403) 448-1249 FAX: (403) 433-0479

UBI
See Upstate Biotechnology

Ugo Basile Biological Research Apparatus
Via G. Borghi 43
21025 Comerio, Varese, Italy
(39) 332 744 574
FAX: (39) 332 745 488
http://www.ugobasile.com

UltraPIX
See Life Science Resources

Ultrasonic Power
239 East Stephenson Street
Freeport, IL 61032
(815) 235-6020 FAX: (815) 232-2150
http://www.upcorp.com

Ultrasound Advice
23 Aberdeen Road
London N52UG, UK
(44) 020-7359-1718
FAX: (44) 020-7359-3650
http://www.ultrasoundadvice.co.uk

UNELKO
14641 N. 74th Street
Scottsdale, AZ 85260
(480) 991-7272　FAX: (480) 483-7674
http://www.unelko.com

Unifab Corp.
5260 Lovers Lane
Kalamazoo, MI 49002
(800) 648-9569　FAX: (616) 382-2825
(616) 382-2803

Union Carbide
10235 West Little York Road, Suite 300
Houston, TX 77040
(800) 568-4000　FAX: (713) 849-7021
(713) 849-7000
http://www.unioncarbide.com

United Desiccants
See Sud-Chemie Performance Packaging

United States Biochemical
See USB

United States Biological (US Biological)
P.O. Box 261
Swampscott, MA 01907
(800) 520-3011　FAX: (781) 639-1768
http://www.usbio.net

Universal Imaging
502 Brandywine Parkway
West Chester, PA 19380
(610) 344-9410　FAX: (610) 344-6515
http://www.image1.com

Upchurch Scientific
619 West Oak Street
P.O. Box 1529
Oak Harbor, WA 98277
(800) 426-0191　FAX: (800) 359-3460
(360) 679-2528　FAX: (360) 679-3830
http://www.upchurch.com

Upjohn
Pharmacia & Upjohn
http://www.pnu.com

Upstate Biotechnology (UBI)
1100 Winter Street, Suite 2300
Waltham, MA 02451
(800) 233-3991　FAX: (781) 890-7738
(781) 890-8845
http://www.upstatebiotech.com

USA/Scientific
346 SW 57th Avenue
P.O. Box 3565
Ocala, FL 34478
(800) LAB-TIPS　FAX: (352) 351-2057
(3524) 237-6288
http://www.usascientific.com

USB
26111 Miles Road
P.O. Box 22400
Cleveland, OH 44122
(800) 321-9322　FAX: (800) 535-0898
FAX: (216) 464-5075
http://www.usbweb.com

USCI Bard
Bard Interventional Products
129 Concord Road
Billerica, MA 01821
(800) 225-1332　FAX: (978) 262-4805
http://www.bardinterventional.com

UVP (Ultraviolet Products)
2066 W. 11th Street
Upland, CA 91786
(800) 452-6788　FAX: (909) 946-3597
(909) 946-3197
http://www.uvp.com

V & P Scientific
9823 Pacific Heights Boulevard, Suite T
San Diego, CA 92121
(800) 455-0644　FAX: (858) 455-0703
(858) 455-0643
http://www.vp-scientific.com

Valco Instruments
P.O. Box 55603
Houston, TX 77255
(800) FOR-VICI　FAX: (713) 688-8106
(713) 688-9345
http://www.vici.com

Valpey Fisher
75 South Street
Hopkin, MA 01748
(508) 435-6831　FAX: (508) 435-5289
http://www.valpeyfisher.com

Value Plastics
3325 Timberline Road
Fort Collins, CO 80525
(800) 404-LUER　FAX: (970) 223-0953
(970) 223-8306
http://www.valueplastics.com

Vangard International
P.O. Box 308
3535 Rt. 66, Bldg. #4
Neptune, NJ 07754
(800) 922-0784　FAX: (732) 922-0557
(732) 922-4900
http://www.vangard1.com

Varian Analytical Instruments
2700 Mitchell Drive
Walnut Creek, CA 94598
(800) 926-3000　FAX: (925) 945-2102
(925) 939-2400
http://www.varianinc.com

Varian Associates
3050 Hansen Way
Palo Alto, CA 94304
(800) 544-4636　FAX: (650) 424-5358
(650) 493-4000
http://www.varian.com

Vector Core Laboratory/
National Gene Vector Labs
University of Michigan
3560 E MSRB II
1150 West Medical Center Drive
Ann Arbor, MI 48109
(734) 936-5843　FAX: (734) 764-3596

Vector Laboratories
30 Ingold Road
Burlingame, CA 94010
(800) 227-6666　FAX: (650) 697-0339
(650) 697-3600
http://www.vectorlabs.com

Vedco
2121 S.E. Bush Road
St. Joseph, MO 64504
(888) 708-3326　FAX: (816) 238-1837
(816) 238-8840
http://database.vedco.com

Ventana Medical Systems
3865 North Business Center Drive
Tucson, AZ 85705
(800) 227-2155　FAX: (520) 887-2558
(520) 887-2155
http://www.ventanamed.com

Verity Software House
P.O. Box 247
45A Augusta Road
Topsham, ME 04086
(207) 729-6767　FAX: (207) 729-5443
http://www.vsh.com

Vernitron
See Sensor Systems LLC

Vertex Pharmaceuticals
130 Waverly Street
Cambridge, MA 02139
(617) 577-6000　FAX: (617) 577-6680
http://www.vpharm.com

Vetamac
Route 7, Box 208
Frankfort, IN 46041
(317) 379-3621

Vet Drug
Unit 8
Lakeside Industrial Estate
Colnbrook, Slough SL3 0ED, UK

Vetus Animal Health
See Burns Veterinary Supply

Viamed
15 Station Road
Cross Hills, Keighley
W. Yorkshire BD20 7DT, UK
(44) 1-535-634-542
FAX: (44) 1-535-635-582
http://www.viamed.co.uk

Vical
9373 Town Center Drive, Suite 100
San Diego, CA 92121
(858) 646-1100 FAX: (858) 646-1150
http://www.vical.com

Victor Medical
2349 North Watney Way, Suite D
Fairfield, CA 94533
(800) 888-8908 FAX: (707) 425-6459
(707) 425-0294

Virion Systems
9610 Medical Center Drive, Suite 100
Rockville, MD 20850
(301) 309-1844 FAX: (301) 309-0471
http://www.radix.net/~virion

VirTis Company
815 Route 208
Gardiner, NY 12525
(800) 765-6198 FAX: (914) 255-5338
(914) 255-5000
http://www.virtis.com

Visible Genetics
700 Bay Street, Suite 1000
Toronto, Ontario
M5G 1Z6 Canada
(888) 463-6844 (416) 813-3272
http://www.visgen.com

Vitrocom
8 Morris Avenue
Mountain Lakes, NJ 07046
(973) 402-1443 FAX: (973) 402-1445

VTI
7650 W. 26th Avenue
Hialeah, FL 33106
(305) 828-4700 FAX: (305) 828-0299
http://www.vticorp.com

VWR Scientific Products
200 Center Square Road
Bridgeport, NJ 08014
(800) 932-5000 FAX: (609) 467-5499
(609) 467-2600
http://www.vwrsp.com

Vydac
17434 Mojave Street
P.O. Box 867
Hesperia, CA 92345
(800) 247-0924 FAX: (760) 244-1984
(760) 244-6107
http://www.vydac.com

Vysis
3100 Woodcreek Drive
Downers Grove, IL 60515
(800) 553-7042 FAX: (630) 271-7138
(630) 271-7000
http://www.vysis.com

W&H Dentalwerk Burmoos
P.O. Box 1
A-5111 Burmoos, Austria
(43) 6274-6236-0
FAX: (43) 6274-6236-55
http://www.wnhdent.com

Wako BioProducts
See Wako Chemicals USA

Wako Chemicals USA
1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
(800) 992-9256 FAX: (804) 271-7791
(804) 271-7677
http://www.wakousa.com

Wako Pure Chemicals
1-2, Doshomachi 3-chome
Chuo-ku, Osaka 540-8605, Japan
81-6-6203-3741 FAX: 81-6-6222-1203
http://www.wako-chem.co.jp/egaiyo/index.htm

Wallac
See Perkin-Elmer

Wallac
A Division of Perkin-Elmer
3985 Eastern Road
Norton, OH 44203
(800) 321-9632 FAX: (330) 825-8520
(330) 825-4525
http://www.wallac.com

Waring Products
283 Main Street
New Hartford, CT 06057
(800) 348-7195 FAX: (860) 738-9203
(860) 379-0731
http://www.waringproducts.com

Warner Instrument
1141 Dixwell Avenue
Hamden, CT 06514
(800) 599-4203 FAX: (203) 776-1278
(203) 776-0664
http://www.warnerinstrument.com

Warner-Lambert
Parke-Davis
201 Tabor Road
Morris Plains, NJ 07950
(973) 540-2000 FAX: (973) 540-3761
http://www.warner-lambert.com

Washington University Machine Shop
615 South Taylor
St. Louis, MO 63310
(314) 362-6186 FAX: (314) 362-6184

Waters Chromatography
34 Maple Street
Milford, MA 01757
(800) 252-HPLC FAX: (508) 478-1990
(508) 478-2000
http://www.waters.com

Watlow
12001 Lackland Road
St. Louis, MO 63146
(314) 426-7431 FAX: (314) 447-8770
http://www.watlow.com

Watson-Marlow
220 Ballardvale Street
Wilmington, MA 01887
(978) 658-6168 FAX: (978) 988 0828
http://www.watson-marlow.co.uk

Waukesha Fluid Handling
611 Sugar Creek Road
Delavan, WI 53115
(800) 252-5200 FAX: (800) 252-5012
(414) 728-1900 FAX: (414) 728-4608
http://www.waukesha-cb.com

WaveMetrics
P.O. Box 2088
Lake Oswego, OR 97035
(503) 620-3001 FAX: (503) 620-6754
http://www.wavemetrics.com

Weather Measure
P.O. Box 41257
Sacramento, CA 95641
(916) 481-7565

Weber Scientific
2732 Kuser Road
Hamilton, NJ 08691
(800) FAT-TEST FAX: (609) 584-8388
(609) 584-7677
http://www.weberscientific.com

Weck, Edward & Company
1 Weck Drive
Research Triangle Park, NC 27709
(919) 544-8000

Wellcome Diagnostics
See Burroughs Wellcome

Wellington Laboratories
398 Laird Road
Guelph, Ontario
N1G 3X7 Canada
(800) 578-6985 FAX: (519) 822-2849
http://www.well-labs.com

Wesbart Engineering
Daux Road
Billingshurst, West Sussex
RH14 9EZ, UK
(44) 1-403-782738
FAX: (44) 1-403-784180
http://www.wesbart.co.uk

Whatman
9 Bridewell Place
C[illegible]on, NJ 07014
(800) 631-7290　FAX: (973) 773-3991
(973) 773-5800
http://www.whatman.com

Wheaton Science Products
1501 North 10th Street
Millville, NJ 08332
(800) 225-1437　FAX: (800) 368-3108
(856) 825-1100　FAX: (856) 825-1368
http://www.algroupwheaton.com

Whittaker Bioproducts
See BioWhittaker

Wild Heerbrugg
Juerg Dedual Gaebrisstrasse 8 CH
9056 Gais, Switzerland
(41) 71-793-2723
FAX: (41) 71-726-5957
http://www.homepage.swissonline.net/dedual/wildheerbrugg

Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik
Utengasse 15/17
CH4005 Basel, Switzerland
(41) 61-681-5151
FAX: (41) 61-681-5058
http://www.wab.ch

Winthrop
See Sterling Winthrop

Wolfram Research
100 Trade Center Drive
Champaign, IL 61820
(800) 965-3726　FAX: (217) 398-0747
(217) 398-0700
http://www.wolfram.com

World Health Organization
Microbiology and Immunology Support
20 Avenue Appia
1211 Geneva 27, Switzerland
(41-22) 791-2602
FAX: (41-22) 791-0746
http://www.who.org

World Precision Instruments
175 Sarasota Center Boulevard
International Trade Center
Sarasota, FL 34240
(941) 371-1003　FAX: (941) 377-5428
http://www.wpiinc.com

Worthington Biochemical
Halls Mill Road
Freehold, NJ 07728
(800) 445-9603　FAX: (800) 368-3108
(732) 462-3838　FAX: (732) 308-4453
http://www.worthington-biochem.com

WPI
See World Precision Instruments

Wyeth-Ayerst
2 Esterbrook Lane
Cherry Hill, NJ 08003
(800) 568-9938　FAX: (858) 424-8747
(858) 424-3700

Wyeth-Ayerst Laboratories
P.O. Box 1773
Paoli, PA 19301
(800) 666-7248　FAX: (610) 889-9669
(610) 644-8000
http://www.ahp.com

Xenotech
3800 Cambridge Street
Kansas City, KS 66103
(913) 588-7930　FAX: (913) 588-7572
http://www.xenotechllc.com

Xeragon
19300 Germantown Road
Germantown, MD 20874
(240) 686-7860　FAX: (240) 686-7861
http://www.xeragon.com

Xillix Technologies
300-13775 Commerce Parkway
Richmond, British Columbia
V6V 2V4 Canada
(800) 665-2236　FAX: (604) 278-3356
(604) 278-5000
http://www.xillix.com

Xomed Surgical Products
6743 Southpoint Drive N
Jacksonville, FL 32216
(800) 874-5797　FAX: (800) 678-3995
(904) 296-9600　FAX: (904) 296-9666
http://www.xomed.com

Yakult Honsha
1-19, Higashi-Shinbashi 1-chome
Minato-ku Tokyo 105-8660, Japan
81-3-3574-8960

Yamasa Shoyu
23-8 Nihonbashi Kakigaracho
1-chome, Chuoku
Tokyo, 103 Japan
(81) 3-479 22 0095
FAX: (81) 3-479 22 3435

Yeast Genetic Stock Center
See ATCC

Yellow Spring Instruments
See YSI

YMC
YMC Karasuma-Gojo Building
284 Daigo-Cho, Karasuma Nisihiirr
Gojo-dori Shimogyo-ku
Kyoto, 600-8106, Japan
(81) 75-342-4567
FAX: (81) 75-342-4568
http://www.ymc.co.jp

YSI
1725-1700 Brannum Lane
Yellow Springs, OH 45387
(800) 765-9744　FAX: (937) 767-9353
(937) 767-7241
http://www.ysi.com

Zeneca/CRB
See AstraZeneca
(800) 327-0125　FAX: (800) 321-4745

Zivic-Miller Laboratories
178 Toll Gate Road
Zelienople, PA 16063
(800) 422-LABS　FAX: (724) 452-4506
(800) MBM-RATS　FAX: (724) 452-5200
http://zivicmiller.com

Zymark
Zymark Center
Hopkinton, MA 01748
(508) 435-9500　FAX: (508) 435-3439
http://www.zymark.com

Zymed Laboratories
458 Carlton Court
South San Francisco, CA 94080
(800) 874-4494　FAX: (650) 871-4499
(650) 871-4494
http://www.zymed.com

Zymo Research
625 W. Katella Avenue, Suite 30
Orange, CA 92867
(888) 882-9682　FAX: (714) 288-9643
(714) 288-9682
http://www.zymor.com

Zynaxis Cell Science
See ChiRex Cauldron

[张意（附录4）]

参考文献

Alexander, W.A., Moss, B., and Fuerst, T.R. 1992. Regulated expression of foreign genes in vaccinia virus under the control of bacteriophage T7 RNA polymerase and the *Escherichia coli lac* repressor. *J. Virol.* 66:2934–2942.

Alkhatib, G., Broder, C.C., and Berger, E.A. 1996. Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J. Virol.* 70:5487–5494.

Altman, J.D., Moss, P.A.H., Goulder, P.J.R., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274:94–96.

Andrews, E.J. 1993. 1993 report of the American Veterinary Medical Association panel on euthanasia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 202:229–249.

Areman, E.M., Simonis, T.B., Carter, C.S., Read, E.J., and Klein, H.G. 1988. Bulk cryopreservation of lymphocytes in glycerol. *Transfusion (Phila.)* 28:151–156.

Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B., and Seed, B. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronan. *Cell* 61:1303–1313.

Ashwell, J.D., DeFranco, A.L., Paul, W.E., and Schwartz, R.H. 1984. Antigen presentation by resting B cells: Radiosensitivity of the antigen-presentation function and two distinct pathways of T cell activation. *J. Exp. Med.* 159:861–869.

Austyn, J.M. and Gordon, S. 1981. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* 11: 805–815.

Banchereau, J. and Steinman, R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–252.

Belyakov, I.M., Wyatt, L.S., Ahlers, J.D., Earl, P., Pendleton, C.D., Kelsall, B.L., Strober, W., Moss, B., and Berzofsky, J.A. 1998. Induction of mucosal CTL response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing HIV 89.6 envelope protein. *J. Virol.* 72:8264–8272.

Bersani-Amado, C.A., Duarte, A.J., Tanji, M.M., Cianga, M., and Jancar, S. 1990. Comparative study of adjuvant-induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. III. Analysis of lymphocyte subpopulations. *J. Rheumatol.* 17:153–158.

Bhattacharya, A., Dorf, M.E., and Springer, T.A. 1981. A shared alloantigenic determinant on Ia antigens encoded by the I-A and I-E subregions: Evidence for I region gene duplication. *J. Immunol.* 127:2488–2495.

Bishop, D.K. and Hinrichs, D.J. 1987. Adoptive transfer of immunity to *Listeria monocytogenes*. The influence of in vitro stimulation on lymphocyte subset requirements. *J. Immunol.* 139:2005–2009.

Bjerrum, O.J. and Schafer-Nielsen, C. 1986. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. *In* Electrophoresis '86 (M.J. Dunn, ed.) pp. 315–327. VCH Publishers, Deerfield Beach, Fla.

Blish, C.A., Gallay, B.J., Turk, G.L., Kline, K.M., Whear, W., and Fink, P.J. 1999. Chronic modulation of the TCR repertoire in the lymphoid periphery. *J. Immunol.* 162:3131–3140.

Bou, G., Villasis-Keever, A., and Paya, C.V. 2003. Detection of JNK and p38 activation by flow cytometry analysis. *Anal. Biochem.* 317:147–155.

Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* Suppl. 21:77–89.

Bragado, R., Lauzurica, P., Lopez, D., and Lopez-De Castro, J.A. 1990. T cell receptor Vβ usage in a human alloreactive response. *J. Exp. Med.* 171:1189–1204.

Brenner, C.A., Tam, A.W., Nelson, P.A., Engleman, E.G., Suzuki, N., Fry, K.E., and Larrick, J.W. 1989. Message amplification phenotyping (MAPPing): A technique to simultaneously measure multiple mRNAs from small numbers of cells. *BioTechniques* 7:1096–1103.

Broder, C.C. and Berger, E.A. 1995. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4^{+} T-cell lines vs. primary macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:9004–9008.

Broder, C.C., Dimitrov, D.S., Blumenthal, R., and Berger, E.A. 1993. The block to HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion in animal cells expressing human CD4 can be overcome by a human cell component(s). *Virology* 193:483–491.

Bronstein, I., Voyta, J.C., Murphy, O.J., Bresnick, L., and Kricka, L.J. 1992. Improved chemiluminescent Western blotting procedure. *BioTechniques* 12:748–753.

Brosterhus, H., Brings, S., Leyendeckers, H., Manz, R.A., Miltenyi, S., Radbruch, A., Assenmacher, M., and Schmitz, J. 1999. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells based on cytokine secretion. *Eur. J. Immunol.* 29:4053–4059.

Bujdoso, R., Hopkins, J., Dutia, B.M., Young, P., and McConnell, I. 1989. Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *J. Exp. Med.* 170:1285–1302.

Bull, D.M. and Bookman, M.A. 1977. Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J. Clin. Invest.* 59:966–974.

Cambier, J.C., Justement, L.B., Newell, K.N., Chen, Z.Z, Harris, L.K., Sandoval, V.M., Klemsz, M.J., and Ransom, J.T. 1987. Transmembrane signals and intracellular "second messengers" in the regulation of quiescent B-lymphocyte activation. *Immunol. Rev.* 95:37–57.

Carayon, P. and Bord, A. 1992. Identification of DNA-replicating lymphocyte subsets using a new method to label the bromo-deoxyuridine incorporated into the DNA. *J. Immunol. Methods* 147:225–230.

Carré, P.C., Mortenson, R.L., King, T.E., Noble, P.W., Sable, C.L., and Riches, D.W.H. 1991. Increased expression of the interleukin-8 gene by alveolar macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 88:1802–1810.

CFR (Code of Federal Regulations) 1990. Title 9: Subchapter A. Animal Welfare. Office of the Federal Register, Washington, D.C.

Chan, D. and Perlstein, M.T. (eds.) 1987. Immunoassay: A Practical Guide. Academic Press, San Diego.

Chang, C.D. and Meienhofer, J. 1978. Solid-phase peptide synthesis using mild base cleavage of *N* alphafluorenylmethoxycarbonylamino acids, exemplified by a synthesis of dihydrosomatostatin. *Int. J. Pept. Protein Res.* 11:246–249.

Cheers, C. and McKenzie, I. 1978. Resistance and susceptibility of mice to bacterial infection: Genetics of Listeriosis. *Infect. Immun.* 19:755–762.

Choi, Y., Kotzin, B., Herron, L., Callahan, J., Marrack, P., and Kappler, J. 1989. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:8941–8945.

Chou, P.Y. and Fasman, G.D. 1974. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13:222–245.

Christianson, S.W., Shultz, L.D., and Leiter, E.H. 1993. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-*scid/scid* mice: Relative contributions of $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1^a donors. *Diabetes* 42:44–55.

Chu, C.C., Paul, W.E. and Max, E.E. 1992. Quantitation of immunoglobulin u-γ1 heavy chain switch region recombination by a digestion-circularization polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6978–6982.

Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., Kuo, Y.H., Brookmeyer, R., Zeiger, M.A., Barditch-Crovo, P., and Siliciano, R.F. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183–188.

Clark, E.A., Shu, G.L., Luscher, B., Draves, K.E., Banchereau, J., Ledbetter, J.A., and Valentine, M.A. 1989. Activation of human B cells. Comparison of the signal transduced by IL-4 to four different competence signals. *J. Immunol.* 143:3873–3880.

Coffman, R.L. 1982. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol. Rev.* 69:5–23.

Coffman, R.L. and Weissman, I.L. 1981. B220: A B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature (Lond.)* 289:681–683.

Cohen, P.L. and Eisenberg, R.A. 1992. The lpr and gld genes in systemic autoimmunity: Life and death in the Fas lane. *Immunol. Today* 13:427–428.

Coons, A.H., Creech, H.J., and Jones, R.N. 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47:200–210.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Turner, S.C., Chen, K.S., Ghaheri, B.A., Ghayur, T., Carson, W.E., and Caligiuri, M.A. 2001a. Human natural killer cells: A unique innate immunoregulatory role for the $CD56^{bright}$ subset. *Blood* 97:3146–3151.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. 2001b. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22:633–640.

Corradin, G., Etlinger, H.M., and Chiller, M. 1977. Lymphocyte specificity to protein antigens. I. Characterization of the antigen-induced in vitro T cell dependent proliferative response with lymph node cells from primed mice. *J. Immunol.* 119:1048–1055.

Cortese Hassett, A.L., Misra, D.N., Kunz, H.W., and Gill, T.J. III. 1991. The major histocompatibility complex of the rat. *In* Immunogenetics of the Major Histocompatibility Complex (R. Srivastava, B.P. Ram, and P. Tyle, eds.) pp. 309–347. VCH, New York.

Cossart, P. and Mengaud, J. 1989. *Listeria monocytogenes:* A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol. Biol. Med.* 6:463–474.

CRC (Chemical Rubber Company). 1975. CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Physical and Chemical Data, 3rd ed., Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Crocker, P. and Gordon, S. 1989. Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 169:1333–1346.

Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M., and Steinman, R.M. 1989. The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell. Immunol.* 118:108–125.

Currier, J.R., Deulofeut, H., Barron, K.S., Kehn, P.J., and Robinson, M.A. 1996. Mitogens, superantigens, and nominal antigens elicit distinctive patterns of TCRB CDR3 diversity. *Human Immunol.* 48:39–51.

Czerkinsky, C., Moldeveanu, Z., Mestecky, J., Nilsson, L., and Ouchterlony, O. 1988. A novel two-color ELISPOT assay. I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods* 115:31–37.

Czerkinsky, C., Anderson, G., Ferrua, B., Nordstrom, I., Quiding, M., Eriksson, K., Larson, L., Hellstrand, K., and Ekre, H. 1991. Detection of human cytokine-secreting cells in distinct anatomical compartments. *Immunol. Rev.* 119:5–22.

Czernik, A.J., Girault, J.-A., Nairn, A.C., Chen, J., Snyder, G., Kebabian, J., and Greengard, P. 1991. Production of phosphorylation state-specific antibodies. *Methods Enzymol.* 201:264–283.

Dal Porto, J., Johansen, T.E., Catipovic, B., Parfitt, D.J., Tuveson, D., Gether, U., Kozlowski, S., Fearon, D., and Schneck, J.P. 1993. A soluble divalent class I major histocompatibilty complex molecule inhibits alloreactive T cells at nanomolar concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6671–6675.

Daniels, M.A. and Jameson, S.C. 2000. Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J. Exp. Med.* 191:335–346.

Danska, J.S., Livingstone, A.M., Paragas, V., and Fathman, C.G. 1990. The presumptive CDR3 of both T cell receptor α and β chains mediate recognition of myoglobin peptides. *J. Exp. Med.* 172:27–33.

Danska, J.S., Pflumio, F., Williams, C., Huner, O., Dick, J.E., and Guidos, C.J. 1994. Rescue of T cell-specific V(D)J recombination in SCID mice by DNA-damaging agents. *Science* 266:450–455.

Davey, R.T. Jr. and Lane, H.C. 1990. Laboratory methods in the diagnosis and prognostic staging of infection with human immunodeficiency virus type 1. *Rev. Infect. Dis.* 12:912–930.

Desmonts, G. and Remington, J.S. 1980. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: Method for increasing sensitivity and specificity. *J. Clin. Microbiol.* 11:562–568.

Doherty, P.C., Topham, D.J., Tripp, R.A., Cardin, R.D., Brooks, J.W., and Stevenson, P.G. 1997. Effector $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunol. Rev.* 159:105–117.

Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W., and Liu, M.A. 1997. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15:617–648.

Downes, C.P., Hawkins, P.T., and Stephens, L. 1989. Identification of the stimulated reaction in intact cells, its substrate supply and the metabolism of inositol phosphates. *In* Inositol Lipids In Cell Signalling (R.H. Michell, A.H. Drummond, and C.P. Downes, eds.) pp. 3–38. Academic Press, San Diego.

Drevets, D.A. and Campbell, P.A. 1991. Macrophage phagocytosis: Use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *J. Immunol. Methods* 142:31–38.

Edelson, P.J. and Cohn, Z.A. 1976. Purification and cultivation of monocytes and macrophages. *In* In Vitro Methods in Cell-Mediated and Tumor Immunity (B.A. Bloom and J.R. David, eds.) pp. 333–340. Academic Press, San Diego.

Eiseman, E. and Bolen, J.B. 1992. Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src-related tyrosine protein kinase. *Nature (Lond.)* 355:78–80.

Engers, H.D. and Fitch, F.W. 1979. An estimate of the minimal frequency of cytolytic T lymphocyte effector cells generated in allogeneic reactions. *J. Immunol. Methods* 25:13–20.

FACS Calibur User's Guide, CELL Quest Software User's Guide, and FACS Calibur FACSComp User's Guide. Becton Dickinson, San Jose, Calif.

Fathman, C.G. and Fitch, F.W. (eds.) 1982. Isolation, Characterization, and Utilization of T Lymphocyte Clones. Academic Press, San Diego.

FDA. 1996. Points to consider on plasmid DNA vaccines for preventative infectious disease indications. U.S. Food and Drug Administration, Docket #96-N-0400.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872–877.

Fiocchi, C. 1985. Lymphoid cells of the gastrointestinal tract. Isolation procedures. *Acta. Chirugica Scand.* Suppl. 525:11–23.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. 1989. Two types of mouse T helper cell IV: TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J. Exp. Med.* 170:2081–2095.

Fleisher, T.A., Marti, G.E., and Hagengruber, C. 1988. Two-color flow cytometric analysis of monocyte-depleted human blood lymphocyte subsets. *Cytometry* 9:309–315.

Fortier, A.H., Polsinelli, T., Green, S.J., and Nacy, C.A. 1992. Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: Identification of cytokines, effector cells, and effector molecules. *Infect. Immun.* 60:817–825.

Fowell, D., McKnight, A.J., Powrie, F., Dyke, R., and Mason, D.W. 1991. Subsets of $CD4^+$ T cells and their roles in the induction and prevention of autoimmunity. *Immunol. Rev.* 123:37–64.

Fox, J.G., Cohen, B.J., and Loew, F.M. (eds.) 1984a. Laboratory Animal Medicine, pp. 522–524. Academic Press, San Diego.

Fox, J.G., Cohen, B.J., and Lowe, F.M. (eds.) 1984b. Laboratory Animal Medicine, pp. 131–132. Academic Press, San Diego.

Frank, S.J., Niklinska, B., Orloff, B., Mercep, M., Ashwell, J.D., and Klausner, R.D. 1990. Structural mutations of the T cell receptor ζ chain and its role in T cell activation. *Science* 249:174–177.

Freudenthal, P.S. and Steinman, R.M. 1990. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:7698–7702.

Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W., and Moss, B. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:8122–8126.

Funderud, S., Nustad, K., Lea, T., Vartdal, F., Guadernack, G., Stensted, P., and Ugelstad, J. 1987. Fractionation of lymphocytes by immunomagnetic beads. *In* Lymphocytes: A Practical Approach (G.G.B. Klaus, ed.) pp. 55–61. Oxford University Press, New York.

Funderud, S., Erikstein, B., Asheim, H.C., Nustad, K., Stokke, T., Blomhoff, H.K., Holte, H., and Smeland, E.B. 1990. Functional properties of $CD19^+$ B lymphocytes positively selected from buffy coats by immunomagnetic separation. *Eur. J. Immunol.* 20:201–206.

Fuss, I.J., Neurath, M.F., Boirivant, M., Klein, J., Strong, S., Fiochhi, C., and Strober, W. 1996. Disparate $CD4^+$ lamina propria (LP) lymphocyte secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-γ, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* 157:1261–1270.

Fynan, E.F., Webster, R., Fuller, D., Haynes, J., Santoro, J., and Robinson, H. 1993. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:11478–11482.

Galley, K.A. and Danska, J.S. 1995. Islet-infiltrating T cells in prediabetic non-obese diabetic mice display limited T cell receptor VDJβ sequence diversity. *J. Immunol.* 154:2969–2982.

Garboczi, D.N., Hung, D.T., and Wiley, D.C. 1992. HLA-A2-peptide complexes: Refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:3429–3433.

Garton, H.J. and Schoenwolf, G.C. 1996. Improving the efficacy of fluorescent labeling for histological tracking of cells in early mammalian and avian embryos. *Anat. Rec.* 244:112–117.

Gascoigne, N.R.J., Goodnow, C., Dudzik, K., Oi, V.T., and Davis, M.M. 1987. Secretion of a chimeric T-cell receptor-immunoglobulin protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:2936–2940.

Geoghegan, K.F. 1996. Modification of amino groups. *In* Current Protocols in Protein Science (J.E. Coligan, B.M. Dunn, D.W. Speicher, and P.T. Wingfield, eds.) pp. 15.2.1–15.2.18. John Wiley & Sons, New York.

Geppert, T.D. and Lipsky, P.E. 1988. Activation of T lymphocytes by immobilized monoclonal antibodies to CD3. Regulatory influences of monoclonal antibodies to additional T cell surface determinants. *J. Clin. Invest.* 81:1497–1505.

Gerhard, W., Mozdzanowska, K., Furchner, M., Washko, G., and Maiese, K. 1997. Role of the B-cell response in recovery of mice from primary influenza virus infection. *Immunol. Rev.* 159:95–103.

Gill, S.C. and von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182:319–326. [published erratum appears in *Anal. Biochem.* 189:283]

Gill, T.J. III, Smith, G.J., Wissler, R.W., and Kunz, H.W. 1989. The rat as an experimental animal. *Science* 245:269–276.

Gill, T.J. III, Nomura, T., Festing, M.F.W., Gunther, E., Kunz, H.W., Moriwaki, K., and Natori, T. 1992. Definition, nomenclature, and conservation of the rat strains. *ILAR News (Institute of Laboratory Animal Resources)* 34:S1–S26.

Gill, T.J. III, Natori, T., Salgar, S.K., and Kunz, H.W. 1995. Current status of the major histocompatibility complex in the rat. *Transplant. Proc.* 27:1495–500.

Gillespie, P.G. and Hudspeth, A.J. 1991. Chemiluminescence detection of proteins from single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:2563–2567.

Glimcher, L.H., Hamano, T., Asofsky, R., Heber-Katz, E., Hedrick, S., Schwartz, R.H., and Paul, W.E. 1982. I region-restricted antigen presentation by B-cell-B lymphoma hybridomas. *Nature* 298:283–284.

Glimcher, L.H., Hamano, T., Asofsky, R., Sachs, D.H., Pierres, M., Samelson, L.E., Sharrow, S.O., and Paul, W.E. 1983. IA mutant functional antigen-presenting cell lines. *J. Immunol.* 130:2287–2294.

Goldschneider, I., Komschlies, K.L., and Greiner, D.L. 1986. Studies of thymocytes in rats and mice. *J. Exp. Med.* 163:1–17.

Gotoh, Y., Nishida, E., Yamashita, T., Hoshi, M., Kawakami, M., and Sakai, H. 1990. Microtubule-associated-protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells: Identity with the mitogen-activated MAP kinase of fibroblastic cells. *Eur. J. Biochem.* 193:661–669.

Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M.R., Watson, J.D., Anderson, D.M., and Giri, J.G. 1994. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor. *Science* 264:965–968.

Graziano, H.J., St-Pierre, Y., Beauchemin, C., Desrosiers, M., and Potworowski, E.F. 1998. The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE. *Exp. Cell Res.* 240:75–85.

Green, C.J. 1987. Anesthesia and analgesia. *In* Laboratory Animals: An Introduction for New Experimenters (A.A. Tuffery, ed.) pp. 261–301. John Wiley & Sons, Chichester, England.

Greenbaum, L.A., Horowitz, J.B., Woods, A., Pasqualini, T., Reich, E.-P., and Bottomly, K. 1988. Autocrine growth of $CD4^+$ T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. *J. Immunol.* 140:1555–1560.

Greten, T.F., Slansky, J.E., Kubota, R., Soldan, S.S., Jaffee, E.M., Leist, T.P., Pardoll, D.M., Jacobson, S., and Schneck, J.P. 1998. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific $CD8^+$ T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:7568–7573.

Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., and Rosenberg, S.A. 1982. Lymphokine-activated killer cell phenomenon: Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 155:1823–1841.

Guillemot, F.P., Oliver, P.D., Peault, B.M., and LeDourain, N.M. 1984. Cells expressing Ia antigen in the avian thymus. *J. Exp. Med.* 160:1803–1819.

Hagel, L. 1998. Gel-filtration chromatography. *In* Current Protocols in Protein Science (J.E. Coligan, B.M. Dunn, D.W. Speicher, and P.T. Wingfield, eds.) pp. 8.3.1–8.3.30. John Wiley & Sons, New York.

Hamelmann, E., Oshiba, A., Paluh, J., Bradley, K., Loader, J., Potter, T.A., Larsen, G., and Gelfand, E.W. 1996. Requirement for $CD8^+$ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J. Exp. Med.* 183:1719–1726.

Hamelmann, E., Schwarze, J., Takeda, K., Oshiba, A., Larsen, G.L., Irvin, C.G., and Gelfand, E.W. 1997. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am. J. Crit. Care Resp. Med.* 156:766–775.

Hames, B.D. and Rickwood, D. (eds.) 1981. Gel Electrophoresis of Proteins. Oxford University Press, New York.

Han, M., Harrison, L., Kehn, P., Stevenson, K., Currier, J., and Robinson, M.A. 1999. Invariant or highly conserved TCRα chains are expressed on double-negative ($CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^-$) and $CD8^+$ T cells. *J. Immunol.* 163:301–311.

Hansen, T.H. and Sachs, D.H. 1989. The major histocompatibility complex. *In* Fundamentals of Immunology, 2nd ed. (W.E. Paul, ed.), pp. 445–488. Raven Press, New York.

Hanson, M.S., Cetkovic-Cvrlje, M., Ramiya, V.K., Atkinson, M.A., Maclaren, N.K., Singh, B., Elliot, J.F., Serreze, D.V., and Leiter, E.H. 1996. Quantitative thresholds of MHC class II I-E expressed on hemopoietically derived antigen-presenting cells in transgenic NOD/Lt mice determine level of diabetes resistance and indicate mechanism of protection. *J. Immunol.* 157:1279–1287.

Harding, C.V. 1995. Phagocytic processing of antigens for presentation by MHC molecules. *Trends Cell Biol.* 5:105–109.

Hardy, R.R. 1986. Purification and characterization of monoclonal antibodies. *In* Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1: Immunochemistry (D.M. Weir, ed.) pp. 13.1–13.13. Blackwell Scientific, Oxford.

Harlow, E. and Lane, D. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Harlow, E. and Lane, D. 1999. Using Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Hart, D.N. and McKenzie, J.L. 1988. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J. Exp. Med.* 168:157–170.

Hasbold, J. and Hodgkin, P.D. 2000. Flow cytometric cell division tracking using nuclei. *Cytometry* 40:230–237.

Haughton, G., Arnold, L.W., Bishop, G.A., and Mercolino, T.J. 1986. The CH series of murine B cell lymphomas: Neoplastic analogues of Ly-1^+ normal B cells. *Immunol. Rev.* 93:35–51.

Haugland, R.P. 1994. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 5th ed. Molecular Probes, Eugene, Ore.

Havran, W.L., Lancki, D.W., Moldwin, R.L., Dialynas, D.P., and Fitch, F.W. 1988. Characterization of an anti-Ly-6 monoclonal antibody which defines and activates cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* 140:1034–1042.

Hedrich, H.J. (ed.) 1990. Genetic Monitoring of Inbred Strains of Rats. Gustav Fischer Verlag, New York.

Helenius, A., McCaslin, D.R., Fries, E., and Tanford, C. 1979. Properties of detergents. *Methods Enzymol.* 56:734–749.

Henkart, P. and Yue, C.C. 1988. The role of cytoplasmic granules in lymphocyte cytotoxicity. *Prog. Allergy* 40:82–110.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & Dev.* 7:2135–2148.

Hjelmeland, J.M. and Chrambach, A. 1984. Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.* 104:305–318.

Ho, M.K. and Springer, T.A. 1982. MAC-1 antigen: Quantitative expression in macrophage populations and tissues, and immunofluorescence localization in spleen. *J. Immunol.* 128:2281–2286.

Ho, D.D., Moudgil, T., and Alam, M. 1989. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Engl. J. Med.* 321:1621–1625.

Ho, D.D., Yoshiyama, H., Mohri, H., Daar, E.S., and Cao, Y. 1991. Quantitation of HIV-1: Significance in pathogenesis and therapy. *In* Viral Quantitation in HIV Infection (J.M. Andrieu, ed.) pp. 3–7. John Libbey Eurotext, Montrouge, France.

Hockett, R.D., Cook, J.R., Findlay, K., and Harding, C.V. 1996. Interferon-γ differentially regulates antigen processing functions in distinct endocytic compartments of macrophages with constitutive expression of class II MHC molecules. *Immunology* 87:68–75.

Hoffmann, T.K., Donnenberg, V.S., Friebe-Hoffmann, U., Meyer, E.M., Rinaldo, C.R., DeLeo, A.B., Whiteside, T.L., and Donnenberg, A.D. 2000. Competition of peptide-MHC class I tetrameric complexes with anti-CD3 provides evidence for specificity of peptide binding to the TCR complex. *Cytometry* 41:321–328.

Holt, P.G., Schon-Hegrad, M.A., and Oliver, J. 1987. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J. Exp. Med.* 167:262–274.

Holton, T.A. and Graham, M.W. 1990. A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucl. Acids Res.* 19:1156.

Hommel, M., Jaffe, C.L., Travi, B., and Milon, G. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89:55–73.

Hoogenboom, H.R., de Bruine, A.P., Hufton, S.E., Hoet, R.M., Arends, J.W., and Roovers, R.C. 1998. Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4:1–20.

Horgan, K.I., Van Seventer, G.A., Shimizu, Y., and Shaw, S. 1990. Hyporesponsiveness of "naive" ($CD45RA^+$) human T cells to multiple receptor-mediated stimuli but augmentation of responses by co-stimuli. *Eur. J. Immunol.* 20:1111–1118.

Houghten, R.A., Pinilla, C., Appel, J.R., Blondelle, S.E., Dooley, C.T., Eichler, J., Nefzi, A., and Ostresh, J.M. 1999. Mixture-based synthetic combinatorial libraries. *J. Med. Chem.* 42:3743–3778.

Hu-Li, J., Ohara, J., Watyson, C., Tsang, W., and Paul, W.E. 1989. Derivation of a T cell line that is highly responsive to IL-4 and IL-2 (CT.4R) and of an IL-2 hyporesponsive mutant of that line (CT.4S). *J. Immunol.* 142:800–807.

Hunkapiller, M.W., Lujan, E., Ostrander, F., and Hood, L.E. 1983. Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis. *Methods Enzymol.* 91:227–236.

Hunter, T. and Sefton, B.M. (eds.) 1991. Protein Phosphorylation, Protein Kinases: Assays, Purification, Antibodies, Functional Analysis, Cloning, and Expression. *Methods Enzymol.* 200.

Ikegami, H., Eisenbarth, G.S., and Hattori, M. 1990. Major histocompatibility complex-linked diabetogenic gene of the nonobese diabetic mouse. Analysis of genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.* 85:18–24.

ILAR Committee on Care and Use of Laboratory Animals. 1985. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH Pub. No. 86-23. U.S. Dept. of Health and Human Services, Washington, D.C.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693–1702.

Inman, J.K. 1975. Thymus independent antigens: The preparation of covalent hapten-Ficoll conjugates. *J. Immunol.* 114:704–709.

Irvine, R.F. 1986. The structure, metabolism, and analysis of inositol lipids and inositol phosphates. *In* Receptor Biochemistry and Methodology, Vol. 7: Phosphoinositides and receptor mechanisms (J.W. Putney, ed.) pp. 89–108. Wiley-Liss, New York.

Irvine, R.F. (ed.) 1990. Methods in Inositide Research. Raven Press, New York.

Ishii, N., Asao, H., and Sugamura, K. 1997. The cytokine receptors: Section report. *In* Leucocyte Typing VI (T. Kishimoto, S. Goyert, H. Kikutani, D. Mason, M. Miyasaka, L. Moretta, T. Ohno, T.A. Springer, H. Sugawara, A.E.G.Kr. von dem Borne, and H. Zola, eds.) pp. 793–801. Garland Publishing, New York and London.

Johnson, P., Williams, A.F., and Woollett, G.R. 1985. Purification of membrane glycoproteins with monoclonal antibody affinity columns. *In* Hybridoma Technology in the Biosciences and Medicine (T.A. Springer, ed.) pp. 163–175. Plenum, New York.

Kappler, J.W., Skidmore, B., White, J., and Marrack, P. 1981. Antigen-inducible H-2 restricted, interleukin-2-producing T cell hybridomas. Lack of independent antigen and H-2 recognition. *J. Exp. Med.* 153:1198–1208.

Kappler, J., White, J., Wegman, D., Mustain, E., and Marrack, P. 1982. Antigen presentation by Ia^+ B cell hybridomas to *H-2*-restricted T cell hybridomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:3604–3607.

Karlsson, E., Arnberg, H., and Eaker, D. 1971. Isolation of the principal neurotoxin of two *Naja naja* subspecies. *Eur. J. Biochem.* 21:1–16.

Kaufmann, S.H.E., Hug, E., and De-Libero, G. 1986. *Listeria monocytogenes* reactive T lymphocyte clones with cytolytic activity against infected target cells. *J. Exp. Med.* 164:363–368.

Kawasaki, E.S. 1990. Amplification of RNA. *In* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (M.A. Innis, J.J. Gelfand, and T.J. White, eds.) pp. 21–27. Academic Press, San Diego.

Kedzierska, K., Mak, J., Mijch, A., Cooke, I., Rainbird, M., Roberts, S., Paukovics, G., Jolley, D., Lopez, A., and Crowe, S. 2000. Granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor augments phagocytosis of *Mycobacterium avium* complex by human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes/macrophages in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* 181:390–394.

Kelly, R.H., Balfour, B.M., Armstrong, J.A., and Griffiths, S. 1978. Functional anatomy of lymph nodes. II. Peripheral lymph-borne mononuclear cells. *Anat. Rec.* 190:5–21.

Kemeny, D.M. and Challacombe, S.J. 1988. ELISA and Other Solid Phase Immunoassays: Theoretical and Practical Aspects. John Wiley & Sons, New York.

Kim, N.W. and Wu, F. 1997. Advances in quantification and characterization of telomerse activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucl. Acids Res.* 25:2595–2597.

Kimoto, M. and Fathman, C.G. 1982. Immunization and long-term culture of murine immune lymph node cells. *In* Isolation, Characterization, and Utilization of T Lymphocyte Clones (C.G. Fathman and F.W. Fitch, eds.) pp. 525–526. Academic Press, San Diego.

Kitas, E., Kung, E., and Bannwarth, W. 1994. Chemical synthesis of *O*-thiophosphotyrosyl peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* 43:146–153.

Klausner, R.D. and Samelson, L.E. 1991. T cell antigen receptor activation pathways: The tyrosine kinase connection. *Cell* 64:875–878.

Klein, J. 1986. Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination. John Wiley & Sons, New York.

Klein, J., Bontrop, R.E., Dawkins, R.L., Erlich, H.A., Gyllensten, U.B., Heise, E.R., Jones, P.P., Parham, P., Wakeland, E.K., and Watkins, D.I. 1990. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: A proposal. *Immunogenetics* 31:217–219.

Klinkert, W.E.F., Labadie, J.H., and Bowers, W.E. 1982. Accessory and stimulating properties of dendritic cells and macrophages isolated from various rat tissues. *J. Exp. Med.* 156:1–19.

Knight, S.C., Balfour, B.M., O'Brien, J., Buttifant, L., Sumerska, T., and Clark, J. 1982. Role of veiled cells in lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* 12:1057–1060.

Köhler, G. and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond.)* 256:495–497.

Kolber, M.A., Quinones, R.R., Gress, R.E., and Henkart, P.A. 1988. Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J. Immunol. Methods* 108:255–264.

Kong, Y.M., McCormick, D.J., Wan, Q., Motte, R.W., Fuller, B.E., Giraldo, A.A., and David, C.S. 1995. Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis: Secondary role of iodination. *J. Immunol.* 155:5847–5854.

Kong, Y.M., Lomo, L.C., Motte, R.W., Giraldo, A.A., Baisch, J., Strauss, G., Hammerling, G.J., and David, C.S. 1996. HLA-DRB1 polymorphism determines susceptibility to autoimmune thyroiditis in transgenic mice: Definitive association with HLA-DRB1*0301 (DR3) gene. *J. Exp. Med.* 184:1167–1172.

Kraal, G., Breel, M., Janse, M., and Bruin, G. 1986. Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 163:981–997.

Kyewski, B.A., Fathman, C.G., and Rouse, R.V. 1986. Intrathymic presentation of circulating non-MHC antigens by medullary dendritic cells. An antigen-dependent microenvironment for T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 163:231–246.

Kyriakis, J.M. and Avruch, J. 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81:807–869.

Kyte, J. and Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105–132.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227:680–685.

Landry, D., Doyon, L., Poudrier, J., Lafontaine, M., Pelletier, M., and Montplaisir, S. 1990. Accessory function of human thymic dendritic cells in a con A-induced proliferation of autologous thymocyte subsets. *J. Immunol.* 144:836–844.

Lanier, L.L., Warner, N.L., Ledbetter, J.A., and Herzenberg, L.A. 1981. Quantitative immunofluorescent analysis of surface phenotypes of murine B cell lymphomas and plasmacytomas with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 127:1691–1697.

Larrick, J.W., Danielsson, L., Brenner, C.A., Abrahamson, M., Fry, K.E., and Borrebaeck, C.A.K. 1989. Rapid cloning of rearranged immunoglobulin genes from human hybridoma cells using mixed primers and the polymerase chain reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1250–1256.

Lautenschlager, I., Halttunen, J., and Hayry, P. 1988. Characteristics of dendritic cells in rat liver. *Transplantation (Baltimore)* 45:936–939.

Lechler, R.I., Norcross, M.A., and Germain, R.N. 1985. Qualitative and quantitative studies of antigen-presenting cell function by using I-A-expressing L cells. *J. Immunol.* 135:2914–2922.

Ledbetter, J.A. and Herzenberg, L.A. 1979. Xenogeneic monoclonal antibodies against mouse lymphocyte differentiation antigens. *Immunol. Rev.* 47:63–90.

Leiter, E.H. 1993. The nonobese diabetic mouse: A model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease. *ILAR News* 35:4–14.

Leiter, E.H. and Serreze, D.V. 1991. Autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse: Suppression of immune defects by bone marrow transplantation and implications for therapy. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 59:323–334.

Leiter, E.H. and Atkinson, M.A. (eds.) 1998. NOD mice and related strains: Origin, husbandry, and biology. *In* NOD Mice and Related Strains: Research Applications in Diabetes, AIDS, Cancer, and Other Diseases. R.G. Landes, Austin, Tex.

Leiter, E.H., Prochazka, M., Coleman, D.L., Serreze, D.V., and Shultz, L.D. 1986. Genetic factors predisposing to diabetes susceptibility in mice. *In* The Immunology of Diabetes Mellitus (M.A. Jaworskil, G.D. Molnar, R.V. Rajotte, and B. Singh, eds.) pp. 29–36. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Lenardo, M., Chan, K.M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J., and Zheng, L. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis—immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol.* 17:221–253.

Li, C.Y., Lam, K.W., and Yam, L.T. 1973. Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21:1–12.

Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents (updated quarterly), Santa Rosa, Calif.

Locker, J., Gill, T.J. III, Kraus, J.P., Ohura, T., Swarop, M., Riviere, M., Islam, M.Q., Levan, G., Szpirer, J., and Szpirer, C. 1990. The rat MHC and cystathionine β-synthase gene are syntenic on chromosome 20. *Immunogenetics* 31:271–274.

Lund, T., O'Reilly, L., Hutchings, P., Kanagawa, O., Simpson, E.R.G., Chandler, P., Dyson, J., Picard, J.K., Edwards, A., Kioussis, D., and Cooke, A. 1990. Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice by transgenes encoding modified I-A β-chain or normal I-E α-chain. *Nature* 345:727–729.

Lycke, N. 1986. A sensitive method for the detection of specific antibody production in different isotypes from single lamina propria plasma cells. *Scand. J. Immunol.* 24:393–403.

Lyons, A.B. 1999. Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell Biol.* 77:509–515.

Lyons, A.B. and Parish, C.R. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171:131–137.

Macatonia, S.E., Taylor, P.M., Knight, S.D., and Askonas, B.A. 1989. Primary stimulation by dendritic cells induces anti-viral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J. Exp. Med.* 169:1255–1264.

Mage, M.G., McHugh, L.L., and Rothstein, T.L. 1977. Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulins: Preparative-scale separation on polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin. *J. Immunol. Methods* 15:47–56.

Mandrell, R.E. and Zollinger, W.D. 1984. Use of zwitterionic detergent for the restoration of antibody-binding capacity of electroblotted meningococcal outer membrane proteins. *J. Immunol. Methods* 67:1–11.

Mantovani, A. 1999. The chemokine system: Redundancy for robust outputs. *Immunol. Today* 20:254–257.

Marshall, P.N., Bentley, S.A., and Lewis, S.M. 1975. An evaluation of some commercial Romanowsky stains. *J. Clin. Pathol. (Lond.)* 28:680.

Mayrhofer, P., Holt, P.G., and Papadimitriou, J.M. 1986. Functional characteristics of the veiled cells in afferent lymph from the rat intestine. *Immunology* 58:379–387.

McCormack, J.M., Sun, D., and Walder, W.S. 1991. A subset of mouse splenic macrophages can constitutively present alloantigen directly to $CD8^+$ T cells. *J. Immunol.* 147:421–427.

McCoy, K.L., Miller, J., Jenkins, M., Ronchese, F., Germain, R.N., and Schwartz, R.H. 1989. Diminished antigen processing by endosomal acidification mutant antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 143: 29–38.

McGarrity, G.J., Sarama, J., and Vanaman, V. 1979. Factors influencing microbiological assay of cell-culture *Mycoplasmas. In Vitro (Rockville)* 15:73–81.

McGarry, M.P. and Stewart, C.C. 1991. Murine eosinophil granulocytes bind the murine macrophage-monocyte specific monoclonal antibody F4/80. *J. Leukocyte Biol.* 50:471–478.

McKenzie, A.N.J., Culpepper, J.A., de Waal Malefyt, R., Briere, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G., Menon, S., de Vries, J.E., Banchereau, J., and Zurawski, G. 1993. Interleukin-13, a novel T cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3735–3739.

McKimm-Breschkin, J.L. 1990. The use of tetramethylbenzidine for solid phase immunoassays. *J. Immunol. Methods* 135:277–280.

Melamed, M.R., Mullaney, P.F., and Mendelsohn, M.L. 1990. Flow Cytometry and Sorting, 2nd ed. Wiley-Liss, New York.

Melhem, M.F., Kunz, H.W., and Gill, T.J. III. 1993. An MHC-linked locus in the rat critically influences resistance to DEN carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:1967–1971.

Miller, G. and Lipman, M., 1973. Release of infectious Epstein Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:190–194.

Miller, S.D. and Karpus, W.J. 1994. The immunopathogenesis and regulation of T-cell mediated demyelinating diseases. *Immunol. Today* 15:356–361.

Miller, S.D., McRae, B.L., Vanderlugt, C.L., Nikcevich, K.M., Pope, J.G., Pope, L., and Karpus, W.J. 1995. Evolution of the T cell repertoire during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol. Rev.* 144:225–244.

Mills, F.C., Brooker, J.S., and Camerini-Otero, R.D. 1990. Sequences of human immunoglobulin switch regions: Implications for recombination and transcription. *Nucl. Acids Res.* 18:7305–7316.

Mitsuya, H., Yarchoan, R., Kageyama, S., and Broder, S. 1991. Targeted therapy of human immunodeficiency virus-related disease. *FASEB J.* 5:2369–2381.

Mocarski, E.S. 1996. Cytomegaloviruses and their replication. *In* Fields Virology (B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds.) pp. 2447–2492. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Mond, J.J., Balapure, A., Feuerstein, N., June, C.H., Brunswick, M., Lindsberg, M-L., and Witherspoon, K. 1990. Protein kinase C activation in B cells by indolactam inhibits anti-Ig-mediated phosphatidylinositol bisphosphate hydrolysis but not B cell proliferation. *J. Immunol.* 144:451–455.

Mond, J.J., Lees, A., and Snapper, C.M. 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu. Rev. Immunol.* 13:655–692.

Montgomery, R.A. and Dallman, M.J. 1991. Analysis of cytokine gene expression during fetal thymic ontogeny using the polymerase chain reaction. *J. Immunol.* 147:554–560.

Morse, H.C., Shen, F.-W., and Hammerling, U. 1987. Genetic nomenclature for loci controlling mouse lymphocyte antigens. *Immunogenetics* 25:71–78.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I: Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348–2357.

Mosmann, T.R., Schumacher, J.H., Fiorentino, D.F., Leverah, J., Moore, K.W., and Bond, M.W. 1990. Isolation of MAbs specific for IL-4, IL-5, and IL-6, and a new TH2-specific cytokine, Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (CSIF, IL-10), using a solid phase radioimmunoadsorbent assay. *J. Immunol.* 145:2938–2945.

Moss, B., Earl, P.L., Cooper, N., Wyatt, L.S., Carroll, M.W., and Elroy-Stein, O. 1998. Expression of protein in mammalian cells using vaccinia viral vectors. *In* Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, eds.)

pp. 16.15.1–16.19.11. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J.

Muller, K., Ehlers, S., Solbach, W., and Laskay, T. 2001. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J. Immunol. Methods* 249:155–165.

Mullin, G.E., Lazenby, A.J., Harris, M.L., Bayless, T.M., and James, S.P. 1992. Increased interleukin-2 mRNA in the intestinal mucosal lesions of Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gastroenterology* 102:1620–1627.

Murphy, K.M., Heimberger, A.B., and Loh, D.Y. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of $CD4^+CD8^+$TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 250:1720–1723.

Myers, L.K., Stuart, J.M., Seyer, J.M., and Kang, A.H. 1989. Identification of an immunosuppressive epitope of type II collagen that confers protection against collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 170:1999–2010.

Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, C., and Phillips, J.H. 1989. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J. Immunol.* 143:3183–3191.

Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., and Okamura, H. 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol.* 19:423–474.

Nathan, C.F. and Gabay, J. 1992. Antimicrobial mechanisms of macrophages. *In* Mononuclear Phagocytes (R. va. Furth, ed.) pp. 259–265. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

National Research Council. 1999. Monoclonal Antibody Production. National Academy Press, Washington, D.C.

Nicod, L.P., Lipscomb, M.F., Weissler, J.C., Lyons, C.R., Alberton, J., and Toews, G.B. 1987. Mononuclear cells in human lung parenchyma: Characterization of a potent accessory cell not obtained by bronchoalveolar lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:818–823.

Niku, S.D., Hoon, D.S.B., Cochran, A.J., and Morton, D.L. 1987. Isolation of lymphocytes from clotted blood. *J. Immunol. Methods* 105:9–14.

Nordon, R.E., Nakamura, M., Ramirez, C., and Odell, R. 1999. Analysis of growth kinetics by division tracking. *Immunol. Cell Biol.* 77:523–529.

Nussbaum, O., Broder, C.C., and Berger, E.A. 1994. Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion-dependent reporter gene activation. *J. Virol.* 68:5411–5422.

Nussenzweig, M.C. and Steinman, R.M. 1980. Contributions of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. *J. Exp. Med.* 151:1196–1212.

Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., Witmer, M.D., and Gutchinov, B. 1982. A monoclonal antibody specific for mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:161–165.

Oi, V.T. and Herzenberg, L.A. 1980. Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. *In* Selected Methods in Cellular Immunology (B.B. Mishell and S.M. Shiigi, eds.) pp. 351–372. W.H. Freeman, New York.

Okamura, H., Tsutsui, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K., Akita, K., Namba, M., Tanabe, F., Konishi, K., Fukuda, S., and Kurimoto, M. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-γ production by T cells. *Nature* 378:88–91.

Oksenberg, J.R., Stuart, S., Begovich, A.B., Bell, R.B., Erlich, H.A., Steinman, L., and Bernard, C.C. 1990. Limited heterogeneity of rearranged T cell receptor Vα transcripts in brains of multiple sclerosis patients. *Nature* 345:344–346.

Oksenburg, T.A., Panzara, M.A., and Steinman, L. 1993. The Polymerase Chain Reaction and the Analysis of the T Cell Repertoire. Medical Intelligence Unit, R.G. Landes, Austin, Tex.

Oldstone, M.B.A., Whitton, J.L., Lewicki, H., and Tishon, A. 1988. Fine dissection of a nine amino acid glycoprotein epitope, a major determinant recognized by lymphocytic choriomeningitis virus-specific class I-restricted H-2Db cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 168: 559–570.

Ortaldo, J.R., Mason, A., and Overton, R. 1986. Lymphokine-activated killer cells: Analysis of progenitors and effectors. *J. Exp. Med.* 164: 1193–1198.

Pamer, E.G. 1997. Immune response to *Listeria monocytogenes*. *In* Host Response to Intracellular Pathogens (S.H.E. Kaufmann, ed.) pp. 131–142. R.G. Landes, Austin, Tex.

Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casourage, A., Zoller, M., and Kourilsky, P. 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor β chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4319–4323.

Pannetier, C., Even, J., and Kourilsky, P. 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today* 16:176–181.

Parham, P. 1983. On the fragmentation of monoclonal IgG_1, IgG_{2a}, and IgG_{2b} from BALB/c mice. *J. Immunol.* 131:2895–2902.

Parish, C.R. 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* 77:499–508.

Pavli, P., Woodhams, C.E., Doe, W.F., and Hume, D.A. 1990. Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology* 70:40–47.

Payne, S.M., Sharrow, S.O., Shearer, G.M., and Biddison, W.E. 1981. Preparative separation of human T cells reactive with the OKT4 monoclonal antibody. *Int. J. Immunopharmacol.* 3:227–232.

Pecanha, L.M., Snapper, C.M., Finkelman, F.D., and Mond, J.J. 1991. Dextran-conjugated anti-Ig antibodies as a model for T cell-independent type 2 antigen-mediated stimulation of Ig secretion in vitro. I Lymphokine dependence. *J. Immunol.* 146:833–839.

Pierce. 1995. A Technical Guide to Antibody/Protein Purification. Pierce, Rockford, Ill.

Pinilla, C., Martin, R., Gran, B., Appel, J.R., Boggiano, C., Wilson, D.B., and Houghten, R.A. 1999. Exploring immunological specificity using synthetic peptide combinatorial libraries. *Curr. Opin. Immunol.* 11:193–202.

Poli, G. and Fauci, A.S. 1992. The effects of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8:191–197.

Pollard, A.M. and Lipscomb, M.F. 1990. Characterization of murine lung dendritic cells: Similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. *J. Exp. Med.* 172:159–168.

Porcelli, S.A. and Modlin, R.L. 1999. The CD1 system: Antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 17:297–329.

Powrie, F., Carlino, J., Leach, M.W., Mauze, S., and Coffman, R.L. 1996. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4$^+$ T cells. *J. Exp. Med.* 183:2669–2674.

Preble, O.T., Black, R.J., Friedman, R.M., Klippel, J.H., and Vilcek, J. 1982. Systemic lupus erythematosis: Presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science* 216:429–431.

Prochazka, M., Serreze, D.V., Frankel, W.N., and Leiter, E.H. 1992a. NOR/Lt; MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice. *Diabetes* 41:98–106.

Prochazka, M., Gaskins, H.R., Shultz, L.D., and Leiter, E.H. 1992b. The NOD-*scid* mouse: A model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 89:3290–3294.

Prussin, C. and Metcalfe, D.D. 1995. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Methods* 188:117–128.

Pugh, C.W., MacPherson, G.G., and Steer, H.W. 1983. Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J. Exp. Med.* 157:1758–1779.

Pure, E. and Vitetta, E. 1980. Induction of murine B cell proliferation by insolubilized anti-immunoglobulins. *J. Immunol.* 125:1240–1242.

Ralph, P., Ho, M.K., Litcofsky, P.B., and Springer, T. A. 1983. Expression and induction in vitro of macrophage differentiation antigens on murine cell lines. *J. Immunol.* 130:108–114.

Ravnik, S.E., Gage, S., and Pollack, S.B. 1988. Self-generating density gradients of Percoll provide a simple and rapid method that consistently enriches natural killer cells. *J. Immunol. Methods* 110:161–168.

Rhodes, J.M. and Agger, R. 1987. Comparison of membrane antigens of mouse dendritic cell types. *Immunol. Lett.* 16:107–112.

Richman, D. 1993. Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1207–1213.

Rickinson, A.B., Moss, D.J., and Pope, J.H. 1979. Long-term T cell-mediated immunity to Epstein-Barr virus in man. II. Components necessary for regression in virus-infected leukocyte cultures. *Int. J. Cancer* 23:610–617.

Robinson, H.L. and Torres, C. 1997. DNA vaccines. *Semin. Immunol.* 9:271–283.

Rochester, C.L., Goodell, E.M., Stoltenborg, J.K., and Bowers, W.E. 1988. Dendritic cells from rat lung are potent accessory cells. *Am. Rev. Respir. Dis.* 138:121–128.

Romani, N., Lenz, A., Glassel, H., Stossel, H., Stanzl, U., Majdic, O., Fritsch, P., and Schuler, G. 1989. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J. Invest. Dermatol.* 93:600–609.

Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., and Schuler, G. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196:137–151.

Rubenstein, S., Familletti, P.C., and Pestka, S. 1981. Convenient assay for interferons. *J. Virol.* 37:755–758.

Saksela, K., Muchmore, E., Girard, M., Fultz, P., and Baltimore, D. 1993. High viral load in lymph nodes and latent human immunodeficiency virus (HIV) in peripheral blood cells of HIV-1-infected chimpanzees. *J. Virol.* 67:7423–7427.

Salzwedel, K., Smith, E.D., Dey, B., and Berger, E.A. 2000. Sequential CD4-coreceptor interactions in human immunodeficiency virus type 1 Env function: Soluble CD4 activates Env for coreceptor-dependent fusion and reveals blocking activities of antibodies against cryptic conserved epitopes on gp120. *J. Virol.* 74:326–333.

Sambrook, J. and Russell, D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sandhu, G.S., Eckloff, B.W., and Kline, B.C. 1991. Chemiluminescent substrates increase sensitivity of antigen detection in Western blots. *BioTechniques* 11:14–16.

Schatz, P.J. 1993. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: A 13 residue consensus peptide specifies biotinylation. *Escherichia coli. Bio/Technology* 11:1138–1143.

Schlossman, S., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J., Kishimoto, T., Morimoto, C., Ritz, J., Shaw, S., Silverstein, R., Springer, T., Tedder, T., and Todd, T. (eds.) 1995. Leucocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press, Oxford.

Schmid, I., Krall, W.J., Uittenbogaart, C.H., Braun, J., and Giorgi, J.V. 1992. Dead cell discrimination with 7-aminoactinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13:204–208.

Schneppenheim, R., Budde, U., Dahlmann, N., and Rautenberg, P. 1991. Luminography—a new, highly sensitive visualization method for electrophoresis. *Electrophoresis* 12: 367–372.

Schreiber, R.D., Hicks, L.J., Celada, A., Buchmeier, N.A., and Gray, P.W. 1985. Monoclonal antibodies to murine gamma interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J. Immunol.* 134:1609–1618.

Schuler, G. and Steinman, R.M. 1985. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161:526–546.

Scobie-Trumper, P. 1987. Animal handling and manipulations. *In* Laboratory Animals: An Introduction for New Experimenters (A.A. Tuffery, ed.) pp. 153–170. John Wiley & Sons, Chichester, England.

Seed, B. 1987. An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. *Nature* 329:840–842.

Serreze, D.V. and Leiter, E.H. 1988. Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice. Potential relation to cytokine deficiencies. *J. Immunol.* 140:3801–3807.

Serreze, D.V. and Leiter, E.H. 1991. Development of diabetogenic T cells from NOD/Lt marrow is blocked when an allo-*H2* haplotype is expressed on cells of hematopoietic origin but not on thymic epithelium. *J. Immunol.* 147:1222–1229.

Serreze, D.V., Prochazka, M., Reifsnyder, P.C., Bridgett, M., and Leiter, E. 1994a. Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin dependent diabetes resistance gene. *J. Exp. Med.* 180:1553–1558.

Serreze, D.V., Leiter, E.H., Christianson, G.J., Greiner, D., and Roopenian, D.C. 1994b. MHC class I deficient NOD-$B2m^{null}$ mice are diabetes and insulitis resistant. *Diabetes* 43:505–509.

Serreze, D.V., Gallichin, W.S., Snider, D.P., Croituru, K., Rosenthal, K.L., Leiter, E.H., Christianson, G.J., Dudley, M.E., and Roopenian, D.C. 1996. MHC class I–mediated antigen presentation and induction of CD8$^+$ cytotoxic T lymphocyte responses in autoimmune diabetes–prone NOD mice. *Diabetes* 45:902–908.

Serreze, D.V., Chapman, H.C., Varnum, D.S., Gerling, I., Leiter, E.H., and Shultz, L.D. 1997. Initiation of autoimmune diabetes in NOD/Lt mice is MHC class I–dependent. *J. Immunol.* 158:3958–3986.

Shapira, S.K., Jabara, H.H., Thienes, C.F., Ahern, D.J., Vercelli, D., Gould, H.J. and Geha, R.S. 1991. Deletional switch recombination occurs in interleukin-4-induced isotype switching to IgE expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:7528–7532.

Shapiro, H.M. 1988. Practical Flow Cytometry, 2nd ed. Wiley-Liss, New York.

Shearer, G.M., Salahuddin, S.Z., Markham, P.D., Joseph, L.J., Payne, S.J., Kriebel, P., Bernstein, D.C., Biddison, W.E., Sarngadharan, M.G., and Gallo, R.C. 1985. Prospective study of cytotoxic T lymphocyte responses to influenza and antibodies to human T lymphotropic virus-III in homosexual men. *J. Clin. Invest.* 76:1699–1704.

Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Birdsall-Maller, I., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., Greiner, D.L., and Leiter, E.H. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunological function in NOD/LtSZ-*scid* mice. *J. Immunol.* 154:180–191.

Sjokin, K., Dalmasso, A.P., Smith, J.M., and Martinez, C. 1963. Thymectomy in newborn and adult mice. *Transplantation* 1:521–525.

Smith, D. and Johnson, K.S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* 67:31–40.

Sonza, S., Maerz, A., Deacon, N., Meanger, J., Mills, J., and Crowe, S. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J. Virol.* 70:3863–3869.

Sorg, R., Enczmann, J., Sorg, U., Heermeier, K., Schneider, E.M., and Wernet, P. 1991. Rapid and sensitive mRNA phenotyping for interleukins (IL-1 to IL-6) and colony-stimulating factors (G-CSF, M-CSF, and GM-CSF) by reverse transcription and subsequent polymerase chain reaction. *Exp. Hematol.* 19:882–887.

Spalding, D., Koopman, W.J., Eldridge, J.H., McGhee, J.R., and Steinman, R.M. 1983. Accessory cells in murine Peyer's patch. I. Identification and enrichment of a functional dendritic cell. *J. Exp. Med.* 157:1646–1659.

Spits, H., Yssel, H., Terhorst, C., and de Vries, J.E. 1982. Establishment of human T lymphocyte clones highly cytotoxic for an EBV-transformed B cell line in serum-free medium: Isolation of clones that differ in phenotype and specificity. *J. Immunol.* 128:95–99.

Springer, T.A. 1980. Cell-surface differentiation in the mouse. Characterization of "jumping" and "lineage" antigens using xenogeneic rat monoclonal antibodies. *In* Monoclonal Antibodies (R.H. Kennett, T.J. McKearn, and K.B. Bechtol, eds.) pp. 185–217. Plenum Press, New York.

Springer, T.A. 1981. Murine macrophage differentiation antigens identified by monoclonal antibodies. *In* Heterogeneity of Mononuclear Phagocytes (O. Foster and M. Landy, eds.) p. 37. Academic Press, New York.

Steinberg, T.H., Haugland, R.P., and Singer, V.L. 1996a. Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains. *Anal. Biochem.* 239:238–245.

Steinberg, T.H., Jones, L.J., Haugland, R.P., and Singer, V.L. 1996b. SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: One-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. *Anal. Biochem.* 239:223–237.

Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D., and Cohn, Z.A. 1979. Identification of a novel cell-type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J. Exp. Med.* 149:1–16.

Subauste, C.S., Koniaris, A.H., and Remington, J.S. 1991. Murine CD8$^+$ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J. Immunol.* 147:3955–3959.

Surh, C.D. and Sprent, J. 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372:100–103.

Suzuki, Y., Orellana, M.A., Schreiber, T.D., and Remington, J.S. 1988. Interferon-γ: The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240:516–518.

Suzuki, Y., Orellana, M.A., Wong, S.Y., Conley, F.K., and Remington, J.S. 1993. Susceptibility to chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not correlate with susceptibility to acute infection in mice. *Infect. Immun.* 61:2284–2288.

Tam, J.P. 1988. High density multiple antigen peptide system for preparation of anti-peptide antibodies. *Methods Enzymol.* 168:7–15.

Tang, T.C., DeVit, M., and Johnston, S. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152–154.

Taub, D.D., Key, M.L., Clark, D., and Turcovski-Corrales, S.M. 1995. Chemotaxis of T lymphocytes on extracellular matrix proteins. Analysis of the in vitro method to quantitate chemotaxis of human T cells. *J. Immunol. Methods* 184:187–198.

Taurog, J.D., Kerwar, S.S., McReynolds, R.A., Sanberg, G.P., Leary, S.L., and Mahowald, M.L. 1985. Synergy between adjuvant arthritis and collagen-induced arthritis in rats. *J. Exp. Med.* 162:962–978.

Tesfaigzi, J., Smith-Harrison, W., and Carlson, D.M. 1994. A simple method for reusing western blots on PVDF membranes. *BioTechniques* 17:268–269.

Thiele, D.L., Kurosaka, M., and Lipsky, P.E. 1983. Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: Delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *J. Immunol.* 131:2282–2290.

Thomas, R. and Lipsky, P.E. 1994. Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 153:4016–4028.

Thompson, C.B., Scher, I., Schaefer, M.E., Lindsten, T., Finkelman, F.D., and Mond, J.J. 1984. Size-dependent B lymphocyte subpopulations: Relationship of cell volume to surface phenotype, cell cycle, proliferative

response, and requirements for antibody production to TNP-Ficoll and TNP-BA. *J. Immunol.* 133:2333–2342.

Todd, J.A., Aitman, T.J., Cornall, R.J., Ghosh, S., Hall, J.R.S., Hearne, C.M., Knight, A.M., Love, J.M., McAleer, M.A., Prins, J.-B., Rodrigues, N., Lathrop, M., Pressey, A., DeLarato, N.H., Peterson, L.B., and Wicker, L.S. 1991. Genetic analysis of autoimmune type 1 diabetes mellitus in mice. *Nature* 351:542–547.

Tosato, G., Pike, S.E., Koski, I., and Blaese, R.M. 1982. Selective inhibition of immunoregulatory cell functions by Cyclosporin A. *J. Immunol.* 128:1986–1991.

Tough, D.F. and Sprent, J. 1994. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* 179:1127–1135.

Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47:187–376.

Trinchieri, G. 1994. Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84:4008–4027.

Trinchieri, G. and Perussia, B. 1985. Immune interferon: A pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol. Today* 6:131–136.

Tuffery, A.A. 1987a. Laboratory Animals: An Introduction for New Experimenters, pp. 225–226. John Wiley & Sons, Chichester, England.

Tuffery, A.A. 1987b. Laboratory Animals: An Introduction for New Experimenters, p. 248. John Wiley & Sons, Chichester, England.

Uchida, T., Ju, S.-T., Fay, A., Liu, Y.-N., and Dorf, M.E. 1985. Functional analysis of macrophage hybridomas. I. Production and initial characterization. *J. Immunol.* 134:772–778.

Ueda, S., Nakai, S., Nishida, Y., Hisajima, H., and Honjo, T. 1982. Long terminal repeat-like elements flank a human immunoglobulin epsilon pseudogene that lacks introns. *EMBO J.* 1:1539–1544.

Uehira, M., Uno, M., Kurner, T., Kikutani, H., Mori, K., Inomoto, K., Uede, T., Miyazaki, J., Nishimoto, H., Kishimoto, T., and Yamamura, K. 1989. Development of autoimmune insulitis is prevented in $E\alpha^d$ but not in $A\beta^k$ NOD transgenic mice. *Int. Immunol.* 1:209–213.

Ullrich, A. and Schlessinger, J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203–212.

Unkeless, J.C. 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.* 150:580–596.

Van Alten, P.J. 1984. Thymectomy and engraftment of thymic tissue. *Methods Enzymol.* 108:10–19.

van der Vliet, H.J., Nishi, N., Koezuka, Y., von Blomberg, B.M., van den Eertwegh, A.J., Porcelli, S.A., Pinedo, H.M., Scheper, R.J., and Giaccone, G. 2001. Potent expansion of human natural killer T cells using alpha-galactosylceramide (KRN7000)-loaded monocyte-derived dendritic cells, cultured in the presence of IL-7 and IL-15. *J. Immunol. Methods* 247:61–72.

Van Regenmortel, M.H. 1994. The recognition of proteins and peptides by antibodies. *In* Immunochemistry (C.J. van Oss and M.H. Van Regenmortel, eds.) pp. 227–300. Marcel Dekker, N.Y.

Van Regenmortel, M.H.V., Briand, J.P., Muller, S., and Plaue, S. 1988. Synthetic polypeptides as antigens. *In* Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 19 (R.H. Burdon, and P.H., van Knippenberg, eds.). Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

von Herrath, M.G., Dockter, J., and Oldstone, M.B.A. 1994. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity* 1:231–242.

Vogel, S.N. and Fertsch, D. 1984. Endogenous interferon production by endotoxin-responsive macrophages provides an autostimulatory differentiation signal. *Infect. Immun.* 45:417–423.

Vogel, S.N. and Fertsch, D. 1987. Macrophages from endotoxin-hyporesponsive (Lps^d) C3H/HeJ mice are permissive for vesicular stomatitis virus because of reduced levels of endogenous interferon: Possible mechanism for natural resistance to infection. *J. Virol.* 61:812–818.

Vogel, S.N., Havell, E.A., and Spitalny, G.L. 1986. Monoclonal antibody-mediated inhibition of interferon-γ-induced macrophage antiviral resistance and surface antigen expression. *J. Immunol.* 136:2917–2923.

Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., and Shortman, K. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: Strong expression of CD8 by a subpopulation of dendritic cells suggests a veto function. *J. Exp. Med.* 176:47–58.

Wahl, L.M., Katona, I.M., Wilder, R.L., Winter, C.C., Haraoui, B., Scher, I., and Wahl, S.M. 1984. Isolation of human mononuclear cell subsets by counterflow centrifugal elutriation (CCE). I. Characterization of B-lymphocyte-, T-lymphocyte-, and monocyte-enriched fractions. *Cell. Immunol.* 85:373–383.

Walker, C.M., Moody, D.J., Stites, D.P., and Levy, J.A. 1986. $CD8^+$ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 234:1563–1566.

Walker, W.S. 1987. Origins of macrophage diversity: Functional and phenotypic analysis of cloned populations of mouse splenic macrophages. *Cell. Immunol.* 107:417–432.

Walker, W.S. 1989. Differential antigen presentation by cloned populations of mouse splenic macrophages. *J. Immunol.* 143:2142–2145.

Waters, S.H., O'Neill, J.J., Melican, D.T., and Appel, M.C. 1992. Multiple TCR Vβ usage by infiltrates of young NOD mouse islets of Langerhans. *Diabetes* 41:308–312.

Weiss, A., Imboden, J., Hardy, K., Manger, B., Terhorst, C., and Stobo, J. 1986. The role of the T3 antigen receptor complex in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 4:593–619.

White, W.J. and Field, K.J. 1987. Anesthesia and surgery of laboratory animals. *In* The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice, Exotic Pet Medicine, 17:5 (J.E. Harkness, ed.) pp. 989–1017. W.B. Saunders, Philadelphia.

Whiteside, T.L. and Herberman, R.B. 1990. Characteristics of natural killer cells and lymphokine-activated killer cells. Their role in the biology and treatment of human cancer. *Immunol. Allergy Clin. N. Amer.* 10:663–704.

Whiteside, T.L., Letessier, E., Hirabayashi, H., Vitolo, D., Bryant, J., Barnes, L., Snyderman, C., Johnson, J.T., Myers, E., Herberman, R.B., Rubin, J., Kirkwood, J.M., and Vlock, D.R. 1993. Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin 2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 53:5654–5662.

Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. 1998. Structural organization of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 23:481–485.

Wicker, L.S., Appel, M.C., Dotta, F., Pressey, A., Miller, B.J., DeLarato, N.H., Fischer, P.A., Boltz, R.C., and Peterson, L.B. 1992. Autoimmune syndromes in major histocompatibility complex (MHC) congenic strains of nonobese diabetic (NOD) mice. The NOD MHC is dominant for insulitis and cyclophosphamide-induced diabetes. *J. Exp. Med.* 176:67–77.

Wicker, L.S., Leiter, E.H., Todd, J.A., Renjilian, R.J., Peterson, E., Fischer, P.A., Podolin, P.L., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Peterson, L.B. 1994. β2 microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulitis or diabetes. *Diabetes* 43:500–504.

Wilchek, M., Miron, T., and Kohn, J. 1984. Affinity chromatography. *Methods Enzymol.* 104:3–55.

Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., and Donaldson, D.D. 1998. Interleukin 13: Central mediator of allergic asthma. *Science* 282:2258–2261.

Wilson, C.M. 1983. Staining of proteins on gels: Comparison of dyes and procedures. *Methods Enzymol.* 91:236–247.

Wiltrout, R.H., Taramelli, D., and Holden, H.T. 1981. Measurement of macrophage-mediated cytotoxicity against adherent and nonadherent target cells by release of ^{111}indium-oxine. *J. Immunol. Methods* 43:319–331.

Wittekind, D. 1979. On the nature of Romanowsky dyes and the Romanowsky-Giemsa effect. *Clin. Lab. Haemat.* 1:247–262.

Wixson, S.K. and Smiler, K.L. 1997. Anesthesia and analgesia in rodents. *In* Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals (D.F. Kohn, S.K. Wixson, W.J. White, and G.J. Benson, eds.) pp. 165–200. Academic Press, San Diego.

Wong, T.W., Klinkert, W.E.F., and Bowers, W.E. 1982. Immunological properties of thymus cell subpopulations: Rat dendritic cells are potent accessory cells and stimulators in a mixed leukocyte culture. *Immunobiol.* 160:413–423.

Wu, B., Shenoy, M., Goluszko, E., Kaul, R., and Christadoss, P. 1995. TCR gene usage in experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis: Usage of multiple TCRBV genes in the $H\text{-}2^b$ strains. *J. Immunol.* 154:3603–3614.

Wucherpfennig, K., Ota, K., Endo, K., Seidman, J.G., Rosenzweig, A., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. 1990. Shared human T cell receptor Vβ usage to immunodominant regions of myelin basic protein. *Science* 248:1016–1019.

Wysocki, L.J. and Sato, V.L. 1978. "Panning" for lymphocytes: A method for cell separation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:2844–2848.

Xiao, X.D., Wu, L., Stantchev, T.S., Feng, Y.-R., Ugolini, S., Chen, H., Shen, Z., Riley, J.L., Broder, C.C., Sattentau, Q.J., and Dimitrov, D.S. 1999. Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:7496–7501.

Yalow, R. and Berson, S.A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39:1157–1175.

Yang, H. and Reinherz, E.L. 2001. Dynamic recruitment of human CD2 into lipid rafts. Linkage to T cell signal transduction. *J. Biol. Chem.* 276:18775–18785.

Yee, J.-K., Friedmann, T., and Burns, J.C. 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell. Biol.* 43:99–112.

Yeh, T.J., McBride, P.T., Overall, J.C. Jr., and Green, J.A. 1982. Automated, quantitative cytopathic effect reduction assay for interferon. *J. Clin. Microbiol.* 16:413–415.

Young, Y.D., Liu, C.C., Perschini, P.M., and Cohn, Z.A. 1988. Perforin-dependent and -independent pathways of cytotoxicity. *Immunol. Rev.* 103:161–202.

Yssel, H., de Vries, J.E., Koken, M., Van Blitterswijk, W., and Spits, H. 1984. Serum-free medium for the generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J. Immunol. Methods* 72:219–227.

Zettlmeissl, G., Gregersen, J.P., Duport, J.M., Mehdi, S., Reiner, G., and Seed, B. 1990. Expression and characterization of human CD4: immunoglobulin fusion proteins. *DNA Cell Biol.* 9:347–353.

Zhou, L.-J. and Tedder, T.F. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* 154:3821–3835.

Zhou, L.-J. and Tedder, T.F. 1996. $CD14^+$ blood monocytes can differentiate into functionally mature $CD83^+$ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:2588–2592.

Zola, H., Neoh, S.H., Mantzioris, B.X., Webster, J., and Loughnan, M.S. 1990. Detection by immunofluorescence of surface molecules present in low copy numbers. High sensitivity staining and calibration of flow cytometer. *J. Immunol. Methods* 135:247–255.

Zvaifler, N.J., Steinman, R.M., Kaplan, G., Lau, L.L., and Rivelis, M. 1985. Identification of immunostimulatory dendritic cells in the synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 76:789–800.

索　　引

T

W

X

(Q-2110.31)

生命科学实验指南系列·典藏版



图解微生物实验指南	精编人类遗传学实验指南
免疫学技术及其应用	单分子技术实验指南
生物衰老：研究方法与实验方案	现代蛋白质工程实验指南
精编细胞生物学实验指南	活细胞成像（原书第二版）
植物蛋白质组学实验指南	遗传变异分析实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）	表皮细胞实验指南
环境基因组学实验指南	分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
实验动物血液生理生化参考手册	精编分子生物学实验指南（原书第五版）
生理学实验指南	现代神经科学研究技术
精编免疫学实验指南	生命科学实验设计指南
酵母遗传学方法实验指南	现代生物化学与分子生物学仪器与设备
人干细胞培养	分子细胞遗传学——技术和应用
抗体制备及使用实验指南	精编蛋白质科学实验指南
病毒的电子显微学研究	实验细胞资源的描述标准与管理规范
植物生物学与生态学实验	实验动物设施运行管理指南
神经生物学实验原理与技术	元基因组学：方法和步骤（影印版）
DNA微阵列实验指南	现代工业微生物学实验技术
基因转移：DNA和RNA的转运与表达	真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
生物实验室管理手册（原书第二版）	动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn
销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号



定价（全套）：4500.00元

[General Information]
书名=精编免疫学实验指南
作者=（美）J.E.科林根，B.E.比勒，D.H.马古利斯，E.M.舍瓦奇，W.斯特罗贝尔编著；曹雪涛译
页数=802
SS号=14076131
DX号=
出版日期=2016.07
出版社=北京科学出版社